الباب الثالث

التقييم الحيوي

لمتبقيات السموم والملوثات البيئية

يعد التقييم الحيوي مقياس لفاعلية عامل مؤثر نشط بيولوجيا سواء أكان العامل طبيعي أو كيميائي أو فسيولوجي أو نفساني من خلال التفاعل الذي يحدثه في المادة الحية بكائن حي .

والتقييم الحيوي مجموعة من الاختبارات يستخدم فيها الكائن الحي كأداة بيولوجية لتقييم مادة أو متبقياتها من خلال مدى تقدير مدي استجابة هذا الكائن المختبر تحت ظروف تتلاشى فيها كل العوامل الأخرى المؤثرة في استجابتة عدا العامل موضع الدراسة ، حيث أن أي تغير في ظروف التجربة يؤدى بدورة للتأثير على العمليات الفسيولوجية و البيوكيمائية و التي تؤثر بدورها على النسبة المئوية للموت (% Mortality : Death) .

والهدف من التعقيم الحيوي :

- تقيم كفاءة متبقيات أو مركبات سامة مختلفة بغرض التفضيل بينها (Screening) حيث يتطلب التخليق المستمر للمركبات السامة والعقاقير خاصة الأدوية والمبيدات تقيم حيوى لها لتعين أنسبها مع عدم وجود تأثيرات جانبية ضارة له (Side effects) على الصحة العامة (Public Heath) أو الحيوانات المستأنسة وحيوانات المزرعة .
- فتستخدم تجارب التعقيم الحيوى (Bioassay) لمقارنة مجموعة من المركبات السامة من حيث قوتها وتخصصها على آفة معنية لاختيار أحسنها أو مقارنة حساسية لمدة أنواع من الكائنات المختبرة تجاه مركب معين لتعين أيها أكثر حساسية أو مقاومة للمركب أو لتقدير الاختلاف معدل الاستجابة لنوع معين.
- اختبار حساسية أو مقارنة أفراد مجموع معين أو جنس معين أو سلالة معينة من الكائنات بغرض التنبؤ بإحتمال ظهور سلالة مقاومة لها في المستقبل .

- دراسة أعراض السمية (Toxic symptoms) الظاهرية أو التشـريحية و النسيجية (Histological exame) والبيوكيمائية (Biochemical index) ليحـدد منها نوعية التسمم الناتج (معدي-لامس-عصبي-تناسلي-تنفسي...) .

- تقدير مدى الاستجابة لأفراد مجموع معين معامل بمجموعـه أخـرى غير معاملة تحت نفس الظروف وتشمل :
  أ- مدى الضرر أو التلف الناتج
  ب- دراسة التأثير السام لبقايا مركب
  ج- دراسة تأثير الصدمة :الصرع (Knockdown)
  ء- النسبة المئوية للموت

- التعرف على تركيز مركب أو متبقيات مركب في العينة وذلـك مـن خلال تقدير النسبة المئوية للموت و المصححة بمعادلة أبـوت Abbots) (Formula تم تعديل القيمة إحصائيا بطريقة فينى حيـث يتـم تعريـض إحدى الأنواع الملائمة والحساسة لمتبقيات هذا المركب السـام وتقديـر نسبة الموت و التى تترجم بعد ذلك إلى تركيز (Concentration) من خـلال منحنى الموت و الذى تم عملة باستخدام سلالة الكائن المختبر الحسـاس ونفس المادة النقية (pure ingredient) لهذه المتبقيات والحصول منها علـى علاقة خطية (Linearity relationship) بين تركيزات المادة النقية المتدرجـة ونسب الموت المقابلة لها وغالبا ما تجرى يوميا لملاشاة التغيرات .

- وتجرى تجارب التعقيم الحيوى لدراسة التسمم الحاد بتعريض السـلالة الحساسة من الكائن المختار لجرعة واحدة مفردة (Single dose) وهو مـا يختلف عما يحدث فى البيئة الطبيعية : تسمم مزمن (Chronic poisoning)

- حيث يتعرض الكائن المختبر يوميا لجرعات صغيرة وعلى فترات طويلة وهو ما يصعب قياسه و تقديره حيث غالبا ما تكون المادة السامة قد تحولت من خلال تمثيلها حيويا طوال فترة التعريض Bio) (transformation : Metabolism أو تحولت بعوامل بيئية طبيعية Trans) (formation بالحرارة و أشعة الشمس والرطوبة كذلك يلاحظ عدم الفترة الحقيقة بين الجرعة و التى تليها وكمية كل منها ومعدل النفاذ والامتصاص لها ومستوى درجة تمثيل الجسم لها و الإخراج للمركب وطرحه خارج الجسم .

- وقد يطلق مصطلح التقييم الحيوى الدقيق (Micro bioassay) وهنا يتطلب العمل دقة عالية فى عمليات استخلاص وتنقية المتبقيات لعزل جزئيات المركب فقط المراد تقديرها كميا عن طريق التقييم الحيوى بعيدا عن المواد المتداخلة معه .

العوامل المؤدية لإختلاف طرق التقييم الحيوي :

تختلف طرق التقييم الحيوي لمتبقيات السموم تبعا لنوعية المركب السام المختبر و تجهيزته (Formula) و نوع الكائن الحي المختبر كالحيوانات الثديية (فئران-أرانب-خنازير غنيا-قرود .....) أو عناكب و حلم أو نيماتودا أو حشرات أو كائنات نباتية أو فطريات أو بكتريا .....، كذلك تختلف بإختلاف الطور المعامل و الجنس و التركيب الطبيعي و الكيميائي للمادة المختبرة ..... و عموما تختلف طرق التقييم الحيوي بإختلاف :

١-نوع الكائن المختبر :

فعلي سبيل المثال تختلف طريقة التقييم الحيوي بإختلاف تجهيزة المركب المختبر فالإيروسولات (Aerosols) مثلا تستخدم مع الكائنات الحية الطائرة كالفراشات و الطيور .....أما طريقة الفيلم المتبقي علي السطح المعامل فتستخدم مع الكائنات الزاحفة أو التي تسير علي السطوح خاصة الملساء كالذباب .

٢-نوعية التسمم :

فالتسمم الحاد (Acute poisoning) : و الذي ينفذ من خلال المعاملة بجرعة واحدة من المركب وخلال زمن تعريض قصير(Short term exposure) في حين يقاس التسمم المزمن (Chronic poisoning) من خلال التعرض لجرعات صغيرة معلومة أو غير معلومة الكمية أو التركيز و لفترة طويلة (Long term exposure) و التي تتراوح بين ٢-٧ سنة وهو ما يماثل ما يتعرض له الكائنات في البيئة الطبيعية .

٣-التفاوت في درجة تحمل أفراد المجموع المعامل :

و هنا يجب وبقدر الإمكان تقليل مدي التفاوت أو الإختلاف الوراثي أو علي الأقل تثبيتها و تقليل الإختلافات الجنسية (من خلال تساوي عدد الذكور مع عدد الإناث أو من خلال إجراء تجربة منفصلة لكل منهما) كذلك تقليل الإختلافات الفردية بين أفراد المجموع من حيث التفاوت في وزن الأفراد المعاملة والعمر والوزن ، ففي حالة الفئران الكبيرة (Rats) يجب وأن يتراوح وزنها بين ٢٠٠-٣٠٠ جرام و يجب وألا يزيد هذا التفاوت في الوزن عن ± ٢٠ % عن المتوسط العام لأوزانها .

وبالنسبة للأرانب يفضل النوع ألبينو (Albino) ويجب وأن يتراوح وزنها بين ٢-٣ كيلو جرام في حين يتراوح وزن خنازيرغنيا (Giunia pig) بين ٣٥٠ -٤٥٠ جم .

كذلك يراعى في الإناث المختارة ألا تكون حاملة (not pregnant) وبكر (Nullipoarus) .

ويلاحظ أن التغير في أي عامل مما سبق يؤدى لتغير في درجة الاستجابة (Response) أي في نسبة الموت .

كذلك يلاحظ تفضيل الأنواع سهلة التربية والمعاملة وسريعة التكاثر والاستجابة العالية لأي تأثير .

٤- اختلاف طرق المعاملة (Method of Application) :

تؤدي إختلاف طرق المعاملة بدورها لاختلاف فى درجة تحمل

الأفراد المعاملة وبالتالي مدى استجابتها السريعة :

- فالمعاملة عن طريق الحقن (Injection) سواء كان في الوريد أو العضل أو تحت الجلد والتي تتم بكمية معلومة (حجم × تركيز) و بالتالي يتسني حساب الجرعة (Dose :D) التي وصلت بالفعل لداخل جسم الكائن .

- أما المعاملة عن طريق الفم (Oral administration) و التي تمكننا أيضا من التأكد من كمية المادة السامة المعامل بها و التي وصلت لداخل

الجهاز الهضمي بالضبط أي داخل القناة المعد معوية (Gastrointestinal duct) وذلك من خلال استعمال إنبوب رفيع يدخل للجهاز الهضمي وهنا يجب الحذر من حدوث ترجيع : قيىء (Vomiting) وتفيد مع السموم المعدية التأثير (Stomach poison) .

- أما المعاملة عن طريق الرش (Spraying) للأسطح أو الأنسجة المختلفة و التي يتغذى عليها الكائن المختبر أو يمشي عليها (لاختبار السموم بالملامسة يستخدم برج بوتر (Potter tower) و بتركيز معلوم ولكن لا يمكن هنا التأكد من تقدير الجرعة (الكمية التي أخذها كل كائن علي حدة) .
- أما المعاملة عن طريق الغمر (Dipping) فيستخدم مع الكائنات الصعب معاملتها بإحدى الطرق السابقة وهنا يتم غمرها في محلول معلوم التركيز ولفترة زمنية معلومة قصيرة حتى لا تتأثر الكائنات المعاملة بالخنق ، ويجب إجراء تجربة مماثلة لبيان أثر المذيب أو المذيبات المستخدمة .
- أما المعاملة السطحية (Toppical Application) فتتم باستخدام ما صة ميكرولترية تعطى قطرات دقيقة (Drops) معلومة الحجم والمحلول المستخدم معلوم التركيز وتعامل هذه القطرات على سطح جزء حساس معين على سطح جسم الكائن المختبر .

٥- تجانس طرق تسجيل النتائج:

حيث يجب الإتفاق على تحديد مقاييس أو معايير كمية لدرجة السمية مثل تحديد الموت القياسي (Standard Mortality) لكل حالة من حالات التأثير ويعبر عن الموت في بعض الكائنات من خلال :

- الفشل التام للعمليات الحيوية (ثدييات)
- توقف القلب (ثدييات)
- فقد القدرة على الحركة أو تأثير للمس (حشرات)
- الذبول العام وتوقف النمو (حشائش)
- توقف نمو الميسليوم أو إنبات الجراثيم (فطريات)
- نقص نمو المستعمرات وعددها (بكتريا) .

٦- عوامل حيوية (Biological factors) :

حيث يجب إختبار نوع الكائن المعامل بحرص شديد ليتناسب والهدف من الدراسات كذلك اختبار العمر والجنس والوزن المناسب .

فتستخدم الإناث أكثر من الذكور رغم أن الذكور أكثر حساسية واستجابة تجاه المركب المختبر نظرا لاعتماد مستوى السمية (الاستجابة) لكمية السم / وزن الجسم

وفى الحشرات يستخدم الطور اليرقي عن الحشرة الكاملة لسرعة نموه فيتضح الاختلاف أكثر في درجة الاستجابة

وكلما زاد عدد الأفراد المختبرة بكل معاملة (treatment) كلما زادت حساسية الاختبار ودقة النتائج المتحصل عليها ونقص الخطأ التجريبى .

ويراعى عند إضافة المادة السامة المختبرة إلى البيئة الغذائية للكائن فإن كمية ونوع الغذاء ومدى إمكانية الحصول علية وبصورة جيدة قد تؤدى لتفاوت في النتائج .

٧- عوامل طبيعية وكيميائية (Physical & chemical Factors) :

يؤثر التفاوت في العوامل الطبيعية والكيميائية لتفاوت في استجابة الكائن موضع الاختبار و التي قد تؤدى لحدوث تحولات للمركب (Trans formation) .

كذلك قد يؤدى عدم إجراء عملية الاستخلاص والتنقية للمركب المختبر وعزلة عن أي مركب أخرى متداخلة معه إلى اختفاء تأثيره أو تتداخل معه في عملية التقييم وبنفس الطريقة التي تتداخل بها المواد المستحلبة .

كذلك عدم إزالة متبقيات المذيب المستخدمة فى الاستخلاص قد يكون لها تأثيرها في الإناث ولهذا يراعى تثبيت نوع المذيب في كل معاملات الاختبار لتثبيت عملية الاستخلاص في كل مرة .

ويراعى لما إذا كان للمذيب المستخدم في الاستخلاص والتنقية أو إذابة متبقيات المركب بعد الاستخلاص

و التنقية لمعاملة الكائن أى التأثير على نتائج التقييم ولهذا تجرى تجربة تقييم حيوى على المذيب فقط حيث تطرح نسب الموت الناتجة من المعاملات الخاصة بالمذيب بمفرده من المعاملات الخاصة بالمذيب والمركب .

كذلك تستخدم المواد المخدرة في حالة اختبار الكائنات الحية النشطة لتسهيل عملية المعاملة و هنا يراعى عمل كونترول خاص لبيان أثر المادة المختبرة على حده ثم طرح نسبة الموت الناجمة عنها إن وجد من نسبة الموت المماثلة للمخدر والمركب المختبر معا .

وبالنسبة لفترة الفحص فغالبا ما تكون خلال أربعة و عشرون ساعة من المعاملة فقد تظهر المادة المختبرة تأثيرها في وقت أقل أو أكثر من ذلك ويفضل للحصول على نتائج أكثر دقة إجراء الفحص عدة مرات على فترات متعاقبة بعد ساعة و ستة ساعات و إثني عشرة ساعة و أربعة و عشرون ساعة .

كذلك يلاحظ أن لحجم القفص (Cadge) الذي تعيش فيه الكائنات المعاملة سواء كانت منفردة أو مجتمعة أو في مجاميع تبعا للجنس (Cadged in groups by Sex) لها تأثيرها على نتيجة التعريض فكلما قل حجمها كلما زادت نسبة الموت .

أنماط التقييم الحيوي :

تختلف أنماط التقييم الحيوي تبعا إلي

١ –تقييم حيوي كيفي أو شبة كمي (Qualitative : Semi quantitative Bioassay)

حيث يتم إجراء التقييم الحيوي بدون عمل منحنى قياس يومي وتكـــون الكائنات الحية موضع الاختبار والمرباة تحت ظروف ذاتية مما يؤدى بـــدورة لأن تكون وحدة التغير اليومي بسيطة ويستخدم في الحالات التالية :

- إيجاد درجة استجابة (سمية) تقريبية للعينات المعاملة .
- دراسة التأثير السام لبقايا السموم على المحاصيل خاصة المســـتخدمة في الغذاء الآدمي أو كعلف للحيوانات .

٢ – التقييم الحيوي الكمي (Quantitative Bioassay) :

وقد يطلق علية التقييم الحيوي الدقيـــق (Micro bioassay) ويتطلـب حساسية ودقة كبيرة في العمل والقياس والحساب وذلك من حيث :

- دقة عمليات الاستخلاص والتنقية لمتبقيات المركب لعزلة عن المـــواد المتداخلة مع متبقيات المركب موضع الدراسة و التي قـــد يكـــون لـــهذه الشوائب المتداخلة أيضا تأثير سام ضمن نتائج السمية : الاستجابة الكليـــة (Total Toxic Responsc) .

- الدقة في اختبار أفراد الكائن الحي المختبر سواء كان حيوان ثديـي أو حشرات أو أكاروس أو نيماتودا فيكون ممثل وبدقة للمجمـــوع المـــأخوذ منه ومتماثل من حيث السن والعمر والوزن والجنس مما يتســـنى معـــه الحصول على درجة استجابة عالية .

- استعمال الطريقة الأنسب في المعاملة بالنســـبة لكـــل نـــوع والكـــائن المعامل الأكثر تخصصا .

- ولتقدير الاستجابة الكمية (Estimation of quantal response) :
  - يجرى تقييم حيوي مباشر (Direct bioassay) حيث تستخدم جرعات متزايدة ومتدرجة من المادة السامة وذلك بهدف الحصول على الجرعة السامة الحرجة .
  - يجرى تقييم غير مباشر (Indirect bioassay) حيث تعطي الأفراد جرعات قياسية وتقدير الإستجابة الناتجة عن كل جرعة .
  - يجرى تقييم الاستجابة الكمية (Quantal response) من خلال تقييم جرعات قياسية وقياس دورة حياة الكائن الحي على وجه الدقة .

٣- التقييم الحيوي الكيفي : الوصفي (Qualitative bioassay) :

ويجرى بغرض قياس فاعلية مركب سام على الكثافة العددية لمجموع كائن حي مختبر من خلال تقدير شدة الأعراض أو الضرر الناتج عن الموت الموضعي : التنكرز (Necrosis) أو التلف (Damage) أو مقدار التثبيط لنظام إنزيمي معين .

فإذا كان الكائن المختبر آفة حشرية أو أكاروسية للنبات (الأوراق - الأزهار - الثمار) فإنه يتم الفحص يوميا خاصة مع بدء موسم التوريق أو الإزهار أو الإثمار ويكون الفحص الدوري على فترات زمنية متتابعة لتقدير عدد هذه الآفات على أي جزء (ورق أو ثمار) .

وفي حالة وجود ثقوب على العائل فإنه يكتفي بعد الثقوب التى دخلت منها هذه الآفة أو خرجت منها أو من خلال تشريح الثمرة لزيادة مستوى دقة الفحص وهنا تسجل النتائج في مراتب تقسيمية كما يلى :

المرتبة الأولى : من صفر - آفة واحدة :

على الورقة أو الزهرة أو الثمرة أو داخلها .

المرتبة الثانية : من ١-٥ آفة :

على الورقة أو الزهرة أو الثمرة أو داخلها .

المرتبة الثالثة : من ٦-٢٠ آفة :
على الورقة أو الزهرة أو الثمرة أو داخلها .
المرتبة الرابعة: من ٢٠-١٠٠ آفة :
على الورقة أو الزهرة أو الثمرة أو داخلها.
المرتبة الخامسة:أكثر من ١٠٠ آفة:
على الورقة أو الزهرة أو الثمرة أو داخلها .

أو تسجل النتائج الخاصة بتقدير الأعراض في صورة الإصابة وشدتها دون الحاجة لتقدير عدد الآفات نفسها وهو ما يستخدم بنطاق واسع في تجارب التقييم الحيوي للسموم الفطرية والبكتريا والنيماتودية لسهولة تقييم مظهر الإصابة عن تقييم عددها لمجهرية حجمها وتكون المراتب التقسيمية كما يلي :

المرتبة الأولى : صفر حيث لا توجد أعراض أو مظاهر إصابة
المرتبة الثانية : إصابة مبدئية بصورة مستعمرات قليلة
المرتبة الثالثة : القمة النامية مملوءة بالإصابة (اللون الأسود بحالة المن)
المرتبة الرابعة : القمة النامية مملوءة بالإصابة + تغطية لقمة الثمار أو القرون
المرتبة الخامسة : القمة النامية مملوء بالإصابة+ تغطية لقمة الثمار + الساق الرئيسي علية بعض المستعمرات حتى الصف الثالث من الورق .
المرتبة السادسة : مستعمرات كثيفة تغطى الساق وحتى سطح التربة
المرتبة السابع : أضرار بالغة بالنبات وظهور أفراد مجنحة مهاجرة
المرتبة الثامنة : أضرار بالغة بالنبات وظهور أفراد مجنحة مهاجرة + القمة النامية ميتة ومازال النبات أخضر
المرتبة التاسعة : كل أجزاء النبات مغطاة باللون الأسود + ذبول واختفاء معالم الحياة بالنبات .

خطوات إجراء التقييم الحيوي :

تتمثل الخطوات الرئيسية في عملية التقييم الحيوي في :

١-جمع أفراد الكائن الحي موضع الاختبار والعناية بها (Collection, Care & Maintenance)

يتم جمع الكائن من أماكن تواجده المتفرقة والمتعددة ليمثل بصدق أفراد مجموعه في الطبيعية ثم يربى بالمعمل لعدة أجيال وبطريقة نموذجية يتوفر معها افضل ظروف للنمو والتطور والتكاثر من حيث كمية ونوعية البيئية للغذائية المقدمة لها ودرجة الحرارة المثلى الملائمة لنموها وتكاثرها (ففي الفئران تكون ٢٣ ±٣ °م و بالأرانب ألبينو ٢٠ ± ٢ °م ودرجة رطوبة نسبية تتراوح بين ٣٠- ٧٠ % (WHO) وحتى يزداد مجموعها وتتعود على الظروف المعملية .

ويراعى جمعها من مناطق لا يستخدم فيها المركب المختبر من قبل أو على الأقل أستخدم و لكن لفترة قصيرة و منذ زمن بعيد .

أما إذا كان الهدف جمع سلالة من أفراد لكائن حي مختبر و مقاومة (Resistance) للمركب أو للمركبات موضع البحث فيجب على الباحث جمعها من منطقة استخدم أو تكرر استخدام المركب موضع البحث بها عدة مرات خلال فترة طويلة و هنا يجب جمعها مباشرة عقب تعرضها الأخير له لضمان قتل الأفراد الحساسة و التى تكون هاجرت إليها أو قبل وصول أفراد حساسة أخرى لهذه المنطقة وانضمامها لما تبقى من أفراد المجموع المقاوم.

ويفضل دائما توافر سلالة حساسة (Susceptible strain) ومربأة لعدة أجيال بدون للمركب المختبر أو لمركب آخر من نفس مجموعته الكيمائية حتى يتسنى للباحث أثاث جيد للمقارنة (Control) أو لعدة أجيال يعتمد عليها .

وتختلف طريقة التربية والجمع والعناية تبعا لنوع الكائن وطـور و دورة حياته في بيئته الطبيعية من حيث تماثل ظروف هذه البيئة المناسبة لـــه مـن حرارة ورطوبة وإضاءة وكمية ونوعية الغذاء .

و تختار الأفراد الأصحاء وتستبعد المريضة أو المشكوك في أمرها كمـا تستبعد الإناث التي تأكل أولادها أو تطردها عند قلـــة الغـذاء أو اختـلاف الحرارة حيث تصاب الأم بهيستيريا .

ويجب فحص البراز للتأكد من خلوه من الطفيليات المعدية مع أخذ عينات من الشعر لفحصه و مراعاة النظافة وتغيير الفرشة والغذاء يوميـا و غسـيل أوانى التربية بالفنيك .

٢-إختيار الأفراد المستخدمة في التقييم الحيـوي (Individual Selecting for bioassay)

حيث يتم إختبار الأفراد المتجانسة (Homogenized individual) من حيث تماثلها فى النوع والجنس والعمل والطور والوزن والحجم وطريقـة التربيـة ونوعية وكمية الغذاء و ذلك تبعاً لنوع الاختبار المستخدم يعطى معه نتـائج أكثر دقة وحساسية .

وقد يستخدم الجنسين معا الذكور و الإناث وذلك تبعا لنوعيـة المركـب المراد إختباره خاصة إذا ما تعذر التفريق بينهما .

كذلك يراعى اختيار الأفراد الأصحاء البالغين خاصة في حالـة الإنـاث فيجب و ألا تكون غير بكر (Nullipoarus) أو حامل (Pregnant) و لهذا يفضل إختيار الإناث عقب الأسبوع الخامس مباشرة و فصلها جنسيا .أما عند إختيار الحشرات فيراعى عدم إستخدام الطور اليرقى الخارج توا من الانسـلاخ أو الأطوار اليرقية و التي ستنسلخ قريبا ويفضل إجراء الاختبار علـى الطـور الذي تجرى علية عملية المكافحة (Control) لتكون نتائج التقييم الحيوي أقـرب ما يكون المواقع .

ويجب استبعاد الأفراد غير الطبيعية (Abnormal) من حيث سلوكها أو الأفراد المصابة بمرض أو المشكوك في أمرها كذلك تستبعد الإناث التى تأكل أولادها أو تطردها (الفئران)

وبالنسبة لعدد الكائنات المستخدمة بكل مكرر (Replicate) أو معاملة (Treatment) فيفضل ألا يقل عن عشرة كائنات خمسة ذكور وخمسة إناث وفى بعض اختبارات الحساسية يفضل استخدام عشرون كائن حي مختبر لكل معاملة وكلما زاد عن المكررات لكل معاملة كلما كان ذلك أفضل حيث يفضل و ألا تقل عن ثلاثة مكررات لكل معاملة (أي ٣ مكرر X ١٠ حيوان بكل معاملة = ٣٠ كائن مختبر) وذلك بغرض تقليل الخطأ التجريبي في النتائج المتحصل عليها عند تحليلها إحصائيا .

أما بالنسبة للحشرات المختبرة فيفضل وأن يتراوح عددها ما بين ٥٠-١٠٠ حشرة / مكرر من المكررات العشرة / معاملة .

كذلك تؤخذ مجموعة بنفس الطريقة كونترول كأساس جيد للمقارنة (Control) يعتمد علية وفى استخدام أي أداة (Vichel) أو مذيب مثلا للمساعدة في إذابة المادة المختبرة فإنه يجب عمل مجموعة كونترول أخرى خاصة بالمذيب لطرح أثره من القيمة النهائية للإختبار فربما له تأثير ضار على الكائن المختبر موضع البحث .

كذلك قد تؤخذ مجموعة مقارنة أخرى ثالثة تسمى بالمجموعة التابعة (Satellite) إذا ما إحتاجت ظروف الإختبار ذلك .

وتوجد مجموعة مقارنة رابعة إذا ما استدعى الاختبار إستخدام مادة مخدرة أثناء المعاملة للحد من النشاط الحركي الزائد للكائن المختبر لبيان تأثيرها فقد يؤدى لزيادة معدل امتصاص المركب المختبر أو العكس وهنا يتم طرح قيمة الاستجابة بها من الاستجابة الكلية كما سبق .

٣-تجهيز محاليل المركب المختبر (Preparation of Solutions):

حيث تذاب وزنة معينة و بدقة من المركب النقي (Active Ingredient : AI) وتذاب في حجم مناسب من المذيب الملائم لها وبتركيز مبدئي وليكن ٢٠-٣٠ % .

يتم عمل تركيزات أخرى متدرجة منه : تخفيفات (Dilutions) ومتضاعفة في صورة متوالية هندسية ١،٢،٤،٨،١٦ أو ١،٣،٩،٢٧،... وذلك لارتباط الأثر السام بقيمة لوغاريتم الجرعة (التركيز) بدرجة كبيرة .

ويجب و أن يكون حجم المذيب المستخدم بكل معاملة ثابت حتى يتسنى تقليل أو ملاشاة أثر المذيب بين المعاملات المختلفة ما أمكن لإحتمال تأثيره على معدل النفاذية والتخلل نتيجة تأثيره على تركيب أغشية الجدر التي يتخللها أو يكون له أثر سام أو تخديري كما يفضل وأن يكون له خاصية الإذابة الكاملة للمركب موضع الإختبار ليتسنى له الإنتشار والتخلل العالي.

وتستخدم المذيبات ذات درجة النقاوة العالية فوجود الشوائب قد تؤثر على الاستجابة والفعل السام للمركب الأصلي ، كذلك يجب و ألا تكون له رائحة أو تأثير طارد (Repelling effect) أو منفر للكائن المختبر خاصة إذا ما تمت المعاملة على البيئة الغذائية للكائن موضع الإختبار .

وتفضل المذيبات المتطايرة (Volatile solvents) في المعاملة القمية : الموضعية Topical application)) أو في حالة معاملة الأسطح لتغطيتها (Coating) أو معاملة البذور (Seed dressing) أما المذيبات الغير متطايرة (Non Volatile solvents) فتستخدم عند المعاملة بالنقع (Impregnate application) أو الغمر (Dipping application) أو مع ورق الترشيح (Filter paper) .

٤-التخدير (Anesthetization) :

قد تستخدم عملية التخدير أثناء عملية التقييم الحيوي لمركب ما وذلك بهدف الحد من النشاط الحركي الذائد للكائن المختبر كالطيور و الحشرات المجنحة و الكائنات الدقيقة الحجم والتي يصعب التحكم في مسكها وتثبتها.

وتختلف كمية المخدر وفترة التخدير حسب نوع الكائن أولا ودرجة نشاطه ثانيا و حتى لا تسبب أي ضرر له أو تغير في درجة استجابته ولهذا يفضل دراسة الأثر الجانبي للمخدر (Side effect) قبل إختياره .

قد يستخدم تيار مستمر من ثاني أكسيد الكربون أو مادة الإثير أو التعريض لدرجات حرارة منخفضة كما يتم التخدير تبعا لنوعية المركب المختبر وطريقة المعاملة .

٥-الاختبارات المبدئية :الأولية (Preliminary tests) :

وتجرى بغرض التحديد المبدئي التقريبي (Tentative) لدرجة استجابة الكائن و التركيزات المختبرة ، حيث يتم إختيار عدة تركيزات بناء على نتائج الأبحاث السابقة على نفس المركب والكائن أو على مركب من نفس مجموعة المركب المختبر .

وتختار التركيزات بمدى يتراوح بين صفر ، ١٠٠% موت ، حيث تختار عدة تركيزات ولكل تركيز عدة مكررات (المكرر عشرة كائنات حية) متماثلة الوزن و العمر و الطور و الجنس و ظروف الاختبار و تجرى عدة مرات إما في نفس اليوم أو في أيام مختلفة كل ذلك لتقليل الخطأ التجريبي ما أمكن .

٦-مجموعة المقارنة : الكونترول (Control (check) group) :

حيث تستخدم مجموعة متماثلة تماما من الكائن الحي المختبر وتحت نفس الظروف المجرى عليها الإختبار فالأفراد من نفس النوع والسلالة المختبرة عليها المركب السام و كذلك من نفس العمر والحجم والوزن ونسبة الجنس ويجرى عليها كل الخطوات السابقة فى التقييم الحيوي عدا خطوة المعاملة : التعريض حيث يتم من خلالها حساب نسبة الموت الطبيعي (Natural mortality : Death) ليتسنى تصحيح نسبة الموت الناجمة عن المركب من خلال تطبيق معادلة أبوت (Abbott,s Formula) على النتائج المتحصل عليها من المعاملة ومن المقارنة :

نسبة الموت الفعلية (المصححة) =
% للموت في المعامل - % للموت بالمقارنة / ١٠٠ - % للموت في المقارنة .

كذلك قد يتم عمل مجموعة كونترول أخرى للمذيب لطرح أثره على الاستجابة إن وجد له تأثير أيضا قد يتم عمل مجموعة مقارنة أخرى للمادة المخدرة المستخدمة مع الكائنات النشطة وطرح تأثير المخدر على مستوى الاستجابة إن وجد له تأثير .

٧-طرق تعليم وترقيم حيوانات الاختبار :

يتم ذلك من خلال وضع رقم المعاملة في أذن الحيوان المختبر أو يقطع إحدى الأصابع أو يوضع كل حيوان في قفص (Cadge) بمفردة ويرقم القفص أو يرقم الكائن بقلم فلوماستر على منطقة الذيل كما بالشكل التالي شكل رقم (٣-١) :

شكل رقم (٣-١) : كيفية ترقيم الحيوانات المختبرة

طرق معاملة الكائنات المختبرة : Methods of Applications (Exposure):

تتعدد طرق المعاملة (التعريض) للكائنات الحية المختبرة بهدف اختيار أنسبها تبعا لنوع الكائن المختبر وجنسه ونوعه وطوره ووزنه ومدة التعريض وطبيعة المركب المختبر وتركيبة الكيميائى وطريقة تأثيره و إمكانيات العمل المتاحة ومستوى الدقة المطلوب في النتائج ومدى توفر الظروف البيئية المناسبة من غذاء وحرارة ورطوبة أثناء الاختبار وقبلة وبعدة حتى لا يؤثر إحداها كعامل خارجي يتدخل في نسبة الموت المتحصل عليها والتي تزداد تدريجيا بزيادة التركيز المعامل به .

ويتم عد الأفراد الميتة بكل معاملة عقب المعاملة بفترة زمنية أو فترات متتابعة خلال فترة أو فترات الملاحظة والتي تختلف من كائن لأخر ومن طريقة معاملة لأخرى .

ويراعى عند الفحص تسجيل ما يلي :

ويراعى عند الفحص تسجيل ما يلي :

١. وقت المعاملة أو التعريض وطولها (Time & Duration of Exposure)
٢. طريقة المعاملة أو التعريض (Method of Exposure)
٣. الأعراض الظاهرة كنتيجة للتأثيرات :

- ملاحظة العضلات من حيث ارتخائها (Muscle relaxation)
- ملاحظة معدل التنفس (Respiration rate)
- ملاحظة ضربات القلب (Heart beat rate)
- الجنس (Female - Male Sex)
- العمر (Age)
- وزن الجسم (Body weight)
- مدى مقاومة الكائنات المعرضة أو إحتمالها (Tolerance) .

١-المعاملة القمية : الموضعية (Topical Application) :

أكثر الطرق شيوعا وانتشارا لسهولة إجرائها ودقتها وإمكانية تطبيقها على عدد كبير من الكائنات و في نفس الوقت استهلاك أقل كمية من المركب السام مع دقة النتائج المتحصل عليها .

وتتم بوضع قطرة من محلول المركب السام المختبر معلوم حجمها بدقة و تتراوح بين ٠,١ - ٢٠ ميكرولتير وذلك على منطقة حساسة من سطح الجسم كالرأس وملحقاته أو منطقة الصدر .

ويتم ذلك باستخدام ماصة ميكرولترية (Micro pipette) أو بجهاز الميكروأبليكيتور (Micro applicator) المعد لذلك وهو حقنة دقيقة يتحرك زراع مكبسها لمسافة بمدلولية التركيز المعلوم و التي تتفق وحركة الميكروميتر فتخرج قطرة ذات حجم ثابت ومعلوم من أبرتها الدقيقة (needle)

الطويلة المثبتة بنهاية المحقن حيث يتناسب حجم هذه القطـــرة مــع الكميــة المعامل بها طرديا (حجم × تركيز = كمية)

وتختلف مكان المعاملة باختلاف نوع وحجم الكائن المختبر ففــي حالــة الفئران يتم وضعها على منطقة الجزع (Trunk) أو فوق الكتف بعــد حلــق (sheaving) بمسافة تبلغ ٤,٥سم ٢ أما بالأرانب فتحلــق منطقــة البطــن أو الصدر وتعامل .

وقد يتم عمل عجينة من المركب يدهن بها المكان ثــم يغطــى بــالبولى إثيلين أو المطاط أو شريط لاصق وهنا يجب عمل كونترول خاص للشـــريط أو الرباط المطاط أو البولى إثيلين خاصة مع اختبارات السمية اللامسة للجلــد لاحتمالية تأثيرها على الحساسية أو الالتهاب الجلدي .

أما بالنسبة للكائنات المختبرة الدقيقة كالحشرات فيتم وضع القطرة علـــى السطح البطني للجسم حيث الإسترنات رقيقة وغير مغلظة يقل بــها الشــيتين خاصة بمنطقة الصدر كمــا بالصرصــار أمــا بالكائنــات الأدق كالجاســيد والبعوض فتوضع القطرة فوق الرأس أو أجزاء الفم أو قرون الأستشـــعار أو على الصدر وملحقاته .

ويجب هنا إختبار المذيب و الذي يجب و أن يتمتع بالصفات التالية :

- غير سام أو قليل السمية وبكلتا الحالتين يتم عمل كونترول خاص بالمذيب لمعرفة نسبة تأثيره على الاستجابة (% للموت)
- أن يكون سريع التطاير (Volatile) عقب وضع القطرة وانتشارها على المساحة المعاملة حتى لا يحدث فقط في التركيز .
- أن يتمتع بدرجة إذابة عالية للمركب المختبر .

وتتم معايرة الجهاز بأخذ وزنة دقيقة جدا وهي ٠,١ جرام من الزئبق ويملأ بها المحقن ثم يضبط المؤشر على إحدى الأحجام وليكن ١ ميكرولتير ثم يشغل الجهاز وتستقبل القطرات بكأس نظيف وجاف وتم وزنه بدقة من قبل وتستقبل فيه عدد معين من القطرات وتوزن ثم يقسم قيمة الوزنة على عدد القطرات فنحصل على وزن القطرة بدقة و عليه يكون :

حجم القطرة = وزن القطرة ÷ كثافة الزئبق

ومن هنا يتم تعديل الحجم بالجهاز على هذا الأساس .

٢-الحقن (Injection) :

وهى الطريقة الوحيدة التى يتم فيها التأكد من كمية الجرعة الداخلة لجسم كل كائن معامل حيث يذاب المركب المختبر وبالتركيز المطلوب في المذيب المناسب أو المادة الحاملة المناسبة كالزيلين أو زيت الذرة أو زيت الزيتون أو زيت الفول السوداني أو البروبلين جليكول حيث يكون المركب بصورة مستحلب زيتي .

ويتراوح المدى المحقون من ٠,٠١ ملل أي ١٠ميكروليتر وحتى ١ ملل ويتم الحقن بواسطة أبره دقيقة حادة حتى لا تحدث نزيف (Bleeding) في موضع وخذها ويتم الحقن ببطيء شديد

ويختلف مكان الحقن باختلاف نوع الكائن المختبر وطوره :

- ففي الثدييات كالفئران يتم الحقن في تجويف الجسم البريتونى (Intarperitonial : IP) وهنا يجب الإحتفاظ بالأبره برهة من الوقت ثم تجذب تدريجيا وببطيء لتلاشى النزيف الذي قد يحدث ومعه بعض جزيئات المركب فيحدث فقد في التركيز .
- أما الحقن الوريدي (Intravenous Injection : IV) فهي الأكثر شيوعا لسرعة حمل جزيئات المركب عبر مجرى الدم فيتوزع سريعا على معظم أعضاء الجسم فتظهر أسرع استجابة .
- وقد يستخدم الحقن العضلي (Intramuscular Injection : IM) أو الحقن تحت الجلد (Intradermal Injection : ID) أو الحقن بالنخاع (Intraspinal

. injection : IS)

- وفى حالة الكائنات المختبرة الدقيقة كالحشرات فيتم الحقن بالأرجل الأمامية لليرقات أما بالطور الكامل فيتم الحقن بين حلقات البطن بالغشاء الرقيق البين حلقي بين الصدر والبطن أو بين الصدر والرأس .

ويعاب على طريقة الحقن ما يلي :

- بطئ وصعوبة إجرائها خاصة مع الأعداد الكبيرة مما يحد إنتشار استخدامها .
- احتمالية حدوث النزيف خاصة مع الشخص المبتدىء عديم الخبرة .
- احتمالية حدوث صدمة للكائن المحقون خاصة عندما يكون المركب المختبر مهيج .

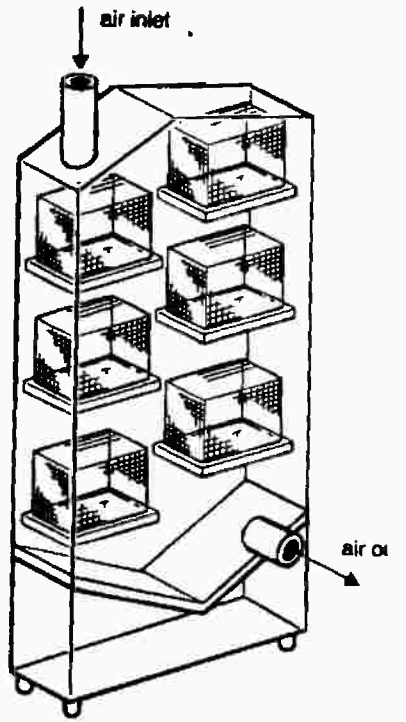
٣-الاستنشاق (Inhalation) :

حيث تعامل الكائنات المختبرة بمادة الاختبار و التي غالبا ما تكون في صورة غازية (Gas) أو رذاذ إيروسولى حيث يتم حساب الكمية المستنشقة بالملليجرام / م ^{٣} / ساعة أو في صورة ضباب (Fog) وهنا يتم استنشاق تيار هواء ساكن فى غرفة (Static Air Flow) يتم فيها حفظ الكائن أو اسطوانات يتم تفريغها من الهواء مع إمكانية التحكم في الضغط داخلها وهنا يكون الجهاز التنفسي هو المتأثر و الشكل رقم (٣-٢) يوضح نماذج لغرف الإستنشاق (Inhalation chambers) فتتمكن باستخدام غرف الاستنشاق من تعريض الحيوان أو المواد البشرية إلي جو ظروفه سبق تقديرها بدقة أكبر فهي بمثابة حجرة محكمة الهواء (Tight room– Air) والتي يمكن فيها تعريض الكائن الحي تحت حالات معلومة ثابتة تؤخذ في الاعتبار عند تصميم الغرفة وهنا يحتوي الجو المختبر علي مادة الاختبار (ايروسولات–سوائل –مواد صلبة متطايرة –غازات –أبخرة أو اتحادات بينهما : غاز و/أو بخار و غاز أو/و ايروسول ...وهكذا)

أما بالنسبة لطبيعة التعريض (Exposure manner) :

١-نظام تعريض الجسم كله (body system-Total) : حيث يتم تعريض الجسم كله سواء أكان لحيوان تجريبي أو بشر .

ولهذه الطريقة مميزاتها وعيوبها فتعريض الجسم كله يؤدي لاتساخه نتيجة التلوث كما يؤدى تداخل سلوك الكائن نفسه مثل ما يحدث عند لعق الحيوان لجلدة (Licking the fur) وهنا فإن أخذ المركب المختبر عن طريق الفم يأخذ مكانه و بكمية معقولة خاصة مع المواد التي يكون فعلها جهازي وهو ما يوضح أهمية و خصوصية نظام تعريض الرأس أو/ و الأنف مع طرق دراسة الايروسولات ، جدول رقم (٣-١) .



شكل رقم (٣-٢) : تخطيط لغرفة إستنشاق لتعريض الجسم كله

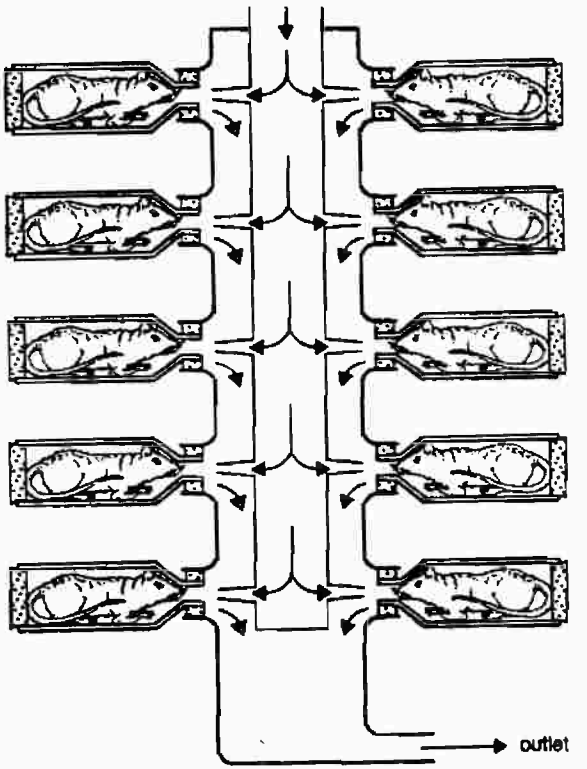
ومن وجهة الأيروديناميك فإن غرف الاستنشاق الأسطوانية (Cylindrical chamber) تعتبر غرف نموذجية لعدم وجود أركان ميتة بها و تماثل معدل السريان بكل مناطقها و بالتالي تساوي تركيز المادة المختبرة في كل أجزائها و من هنا تـكون كل الحيوانات معرضة لنفس التركيز المستخدم خاصة مع الايروسولات والتي تعد مادة ترسب و إستقرار .

و أغلب الغرف يكون لها أربعة أو ست أوجه والسطح و القاعدة سطحيه أو بشكل هرمي وهنا تكون ذات ستة أوجه وقاعدة مثلثة و سقف مخروطي بهدف التأكد من أمثلية التوزيع المتوقع للمادة (الجو) المختبرة و غالبا ما يدخل الهواء من قمة الغرفة ويصرف من مركز القاعدة المسطحة مع الأخذ في الاعتبار أن أي شيء موضوع داخل الغرفة يؤدي لاضطراب في حركة و انسياب الهواء بداخلها و هو ما يؤدي بدوره في النهاية علي توزيع المادة المختبرة خاصة الايروسولات ، شكل رقم (٣-٣).

جدول رقم (٣-١) : مميزات و عيوب تعريض الجسم كله أو الرأس أو / و الأنف في تجارب الاستنشاق

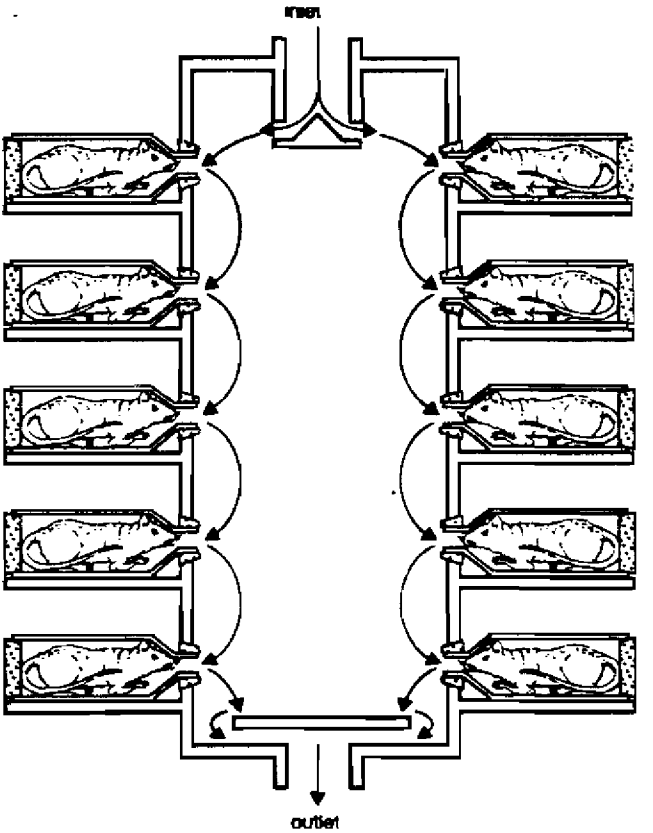
تعريض الجسم كله	تعريض الرأس أو / الأنف
تمتاز باستخدام عدد كبير من الحيوانات تعرض تلقائيا . يتحرك الحيوانات بحرية تامة و بدون أي ضغط تظهر الأعراض السريرية بسرعة. مناسبة للدراسة علي المدى القصير و الطويل	يتم التعريض بدون تلوث الجسم بالمادة المختبرة. لا يمكنها التحرك بحرية لصغر المكان نسبيا . تحتاج لكمية صغيرة من المادة المختبرة . يمكن زيادة أو نقص التركيزات بسرعة.
عيوبها : سطح الجسم كلة معرض . تحتاج الي كمية كبيرة من المادة المختبرة. أتلاف مدي تركيزات المادة المختبرة كثيرا في عدة مستويات . تحتاج الغرفة لمساحة كبيرة . زيادة أو نقص التركيزات يكون بطيء . تلوث جو الاختبار نتيجة الفضلات و التبول تكاليف تأسيس عالية نسبيا	ضغط و عدم راحة من تثبيتها . لا تلاحظ السلوك و الأعراض السريرة بسهولة. تعريض عدد كبير ليس عملي .

٢-نظام تعريض الرأس أو/ والأنف (Head / Nose only system) : حيث يتم تعريض الرأس أو الأنف فقط للجو المختبر . وتتكون معدات التعريض هنا من اسطوانات ذات جدار مفرد أو مزدوج مغلق ، شكل رقم (٣-٣) ، حيث توجد فتحات في حائط الأسطوانة بكل منها حيوان واحد مثبتة في حامل من الزجاج أو البلاستيك وإحدى نهايتها مخروطية الشكل بحيث يجعل رأس وعنق الحيوان مثبت بداخلها ويساعد في ذلك وجود موقف سطح (Stopper) بحيث يقفل الفتحة جيدا ويمنع سحب الحيوان لرقبته للخلف (Retracting) فيوقف تسرب الهواء المعامل .



شكل رقم (٣-٣) : حجرة تعريض الرأس أو / والأنف
نظام الحائط المزدوج (Double wall system)

أما الغرفة ذات الحائط المـــزدوج ، شـــكل رقـــم (٣-٤) و تتمـــيز بـــأن الحيوانات المعرضة فيها دائما ما تستنشق هواء جوي طازج أول بأول وهـــو ما لا يتوافر في نظام الحائط المفرد حيث تستنشق الحيوانات المعرضة هـــواء تم استنشاقه من حيوانات أخري بنفس الغرفة .



شكل رقم (٣-٤) : حجرة تعريض الرأس أو / و الأنف :
نظام الحائط المفرد (Single wall system)

٣-نظام تعريض الرئة أو جزء منها وهي طريقة جائرة (Invasive) وتستخدم فقط تحت التخدير العام و قلما تستخدم .

- ويتم اختيار المواد المصنوعة منها الغرف و الحوامل فقد تكون من الصلب الذي لا يصدأ و الخامل كيماويا وقوي واه قوة احتمال عالية إلا أنه مكلف من الناحية الاقتصادية. و قد تكون من الألومنيوم فيكون أقل تكلفة إلا أنه غير خامل كيماويا . أما في حالة تصنيعية من البلاستيك فيتميز بخفة الوزن والشفافية وسهولة تداوله لكن يعيبه نقص المتانة و الضعف علاوة علي الكهربية الاستاتيكية و حساس للتخريب بالكيماويات

- و قد تصنع من الزجاج و المتميز بالشفافية وأنه خامل كيماويا و غير مكلف ولكنه سهل الكسر وصعب التصنيع .

- و بالنسبة لحجرة الإعاشة في غرف الاستنشاق الخاصة بالجسم كله فيجب و أن يكون مكان حمل الحيوان من الصلب الغير قابل للصدأ . و يجب استخدام الحجر المفردة (Single housed) إذا ما كانت المادة المختبرة ايروسول و لا يجب وضع عدة حيوانات في حجرة واحدة حيث يمكن أن تخفي أنفها في فرو الجسم وهو ما يعد بمثابة مرشح للهواء المستنشق في حين لا يتأثر التعرض حالة كون المادة المختبرة غاز أو أبخرة .
- ويصعب تثبيت درجة الحرارة والرطوبة النسبية إذا ما احتوت غرف الاستنشاق علي عدد كبير من الحيوانات و أكثر من ذلك فإن تركيزات الغاز المستنشق بالحيوانات و نواتج التمثيل و الانهيار المختلفة للبراز و اليورين تصبح غير مقبولة و هو ما يعود بنا إلي القاعدة العامة وهي بأنه لا يجب وأن يزيد الحجم الكلي لعدد الحيوانات عن ٥ % من حجم الغرفة .

- أما بالنسبة لهواء جو الاختبار (Test atmosphere) فيجب و أن يكون نظيف و خالي من الملوثات حيث يزود مصدر التهوية (Ventilation)

بمرشحات للأتربة و مرشحات تحتوي علي كربون نشط كما يجب و أن يكون الهواء جاف و بارد بحيث تكون في النهاية درجة حرارة غرفة الاستنشاق تتراوح بين ٢٠-٢٤°م و الرطوبة النسبية ٤٠-٧٠% كما يجب و ألا تزيد سرعة الهواء عن ٠,٢ متر /ثانية ، شكل رقم (٩-٤) .

- أما بالنسبة لتوليد جو الاختبار سواء أكان غاز أو بخار خاصة و أن لهما نفس حالة التقلب (Aggregation) فالبخار في حالته الغازية تكون له درجة غليان أعلي من درجة حرارة الغرفة العادية .
- وحرارة توليد الغاز أو الأبخرة المستخدمة يجب و أن تكون ثابتة و متحكم فيها و عموما يمكن الحصول عليها من أسطوانات غاز جاهزة .و بتوليدها من خلال طرق طبيعية أو كيماوية أو ببخر السوائل أو تطاير المواد الصلبة .
- ويختلف توليد جو الاختبار للغازات و الأبخرة في أنظمة التعريض الاستاتيكية : فهو نظام مقفل لا يوجد به تجديد حيث يقل المحتوي الأكسجيني به تدريجيا نتيجة تنفس حيوانات التجريب وهو بدورة ما يؤدى لارتفاع ثاني أكسيد الكربون و الرطوبة النسبية بدرجة غير مقبولة و هنا يجب توافر وسائل لقياس استهلاك الأكسيجين و إزالة ثاني أكسيد الكربون و أبخرة الماء من جو الاختبار و لهذا غالبا ما يستخدم مع تجارب فترات التعريض القصيرة و الأعداد القليلة من حيوانات التعريض و علي وجه الخصوص تجارب تمثيل المواد المتطايرة .
- و عليه يتم توليد جو الاختبار في هذا النظام للغازات أو المواد السائلة المتطايرة بتقديم كمية معلومة من الغاز أو المادة السائلة المتطايرة إلى نظام معلوم الحجم و عليه يقلل الضغط بعض الشيء بحيث بعد إدخال الغاز أو المادة السائلة المتطايرة و تطايرها فإن الضغط يرجع مرة أخرى لحالته الأولية . ويعبر عن تركيز الغاز في جو الاختبار بالجزء في المليون :

تركيز الغاز (PPM) = حجم الغاز بالمل(V_g) / حجم النظام بالمتر (V_s x ١٠٠٠)

- و يمكن أيضا حساب التركيز بالملليجرام /لتر أو بالملليجرام / متر مكعب. ويمكن استخدام قانون أفوجادرو والذي يبين عدد الجزيئات الموجودة في الحجوم المتساوية من الغازات و التي تتساوى عند الضغط و درجة الحرارة فعند درجة حرارة ٢٠°م و ضغط ١ جوي فإن ١ مول من الغاز يأخذ حجم قدره ٢٤,٢١ لتر و عند التعبير عن التركيز بالملليجرام / متر مكعب فإن المعادلة تصبح :

تركيز الغاز (ملليجرام /م٣) =

حجم الغاز(مللج) / حجم النظام (V_{0} x ١٠٠٠ x (مول/ ٢٤,٢١)

- أما في النظام الديناميكي و الذي يتميز بتوليد جو اختبار ثابت (constants atmosphere) حيث تضاف بانتظام كمية معلومة من أسطوانة المادة المختبرة إلي تيار الهواء المستمر أو من عملية كيميائية و هنا يتأثر إنتاجها بعوامل التفاعل (حرارة و ذوبان ...) وهو ما يجعل توليد الغاز في جو الاختبار صعب جدا أو من عملية طبيعية (تحليل كهربيElectrolysis :أو انهيار حراري Thermal decomposition: تفاعلات ضوء كيماويةPhotochemical reactions : أو التأين : Ionization) .
- و عموما هناك طرق مختلفة لتوليد جو الاختبار و أكثرها شيوعا الحقن المباشر بسائل عالي التطاير أو تذرير السوائل فتتبخر بعدها بسرعة أو تبخير المادة علي سطح ساخن أو الانتشار من خلال أنبوبة منفذة.

و يعبر عن تركيز المادة في جو الاختبار بطريقين :

- **التركيز النظري (Nominal concentration)** : وهو التركيز الذي يمكن وجودة نظريا و بالتالي حسابه من الكمية الحيوانات المستخدمة من المادة و حجم الهواء أو الغاز خلال توزيعها .
- **التركيز الفعلي(Actual concentration)** :وهو التركيز المقاس معمليا .

- و المفروض أن النتيجتين واحدة و لكن من الناحية العملية فإن التركيز الفعلي عادة ما يكون أقل من النظري وهو غالبا ما يكون ناتج عن الامتصاص بالحوائط أو الثبات أو التمثيل أو التسرب .
- و غالبا ما يقاس التركيز خلال تجارب الاستنشاق بالكروماتوجرافي الغازي(Gas Chromatography : GLC) أو بالكروماتوجرافي الغازي فائق القدرة(High Performance Liquid Chromatography H.P.LC) أو بالأشعة التحت حمراء (Infra Red :IR) أو التحليل اللوني(Colorimetry or Spectro photometry) أو كاشفات أو مستشعرات متخصصة(Detectors) لذلك أو طرق التحليل الكيماوية الكلاسيكية .
- أما بالنسبة للايروسولات المستخدمة فقد تكون جسيماتها متساوية الحجم (Mono disphere) وتستخدم في المعايرة و دراسة الترسب و الاستقرار في القناة التنفسية .أما إذا كانت ذات جسيمات مختلفة أو متفاوتة في الحجم (Poly disphere) و تمثل أغلب أنواع الايروسولات المتعرض لها البشر و لهذا تستخدم في غالبية دراسات السمية بالاستنشاق .
- و من الأهمية بمكان في دراسات الاستنشاق بالايروسولات توليد جسيمات يمكنها الدخول و التوزيع في مسار الهواء و هو ما يتوقف بدورة علي حجم الجسيم : القطر الهندسي أو القطر الايروديناميكي كمقياس للقطر (Geometric diameter) والضروري تقديره وهو سهل بالنسبة للجسيمات الكروية (Globular) و يصعب تقديره مع الجسيمات الغير منتظمة الشكل ولأهميته في تجارب السمية بالاستنشاق سمي بالقطر الايروديناميكي و يعرف علي أنه قطر الكرة ذات الكثافة ١ و التي لها نفس معدل الترسب كجسيمة و هو ما يعني بأن الجسيم الذي له قطر ايروديناميكى ٥ ميكروميتر له نفس معدل الترسيب في الهواء لكرة لها قطر ٥ ميكروميتر و كثافة ١.
- أما الجسيمات الهفو : الذغبية (Fluff) و التي لها مساحة مسطح كبير و كثافة منخفضة يكون قطر الايروديناميكي لها صغير جدا بينما القطر الهندسي كبير نسبيا . و لهذا فقطع الرصاص الصغيرة ذات

الكثافة العالية و مساحة المسطح الصغيرة يكـــون تشـــبثها و مســـكها بالهواء قليلة .

- أما بالنسبة لزيادة الشحنة الكهروستاتيكية (Electrostatic charge) و التـــي تكتسبها جسيمات الإيروسول عند احتكاكها مع السطح الداخلـــي لمولـــد الإيروسولات فلها تأثير كبير علي سلوك الجسيمات في مسارات الـــهواء و درجة التجمع و الترسيب . و يتأين هواء الإيروســـول فـــإن الشـــحنة الكهروستاتيكية تتبادل جزئيا .
- ويتم الفحص لتقدير الاستجابة (نسبة الموت) بعد ٢٤-٤٨ ساعة من التعرض .
- و تدخل جزئيات المركب المختبر خلال الفتحات التنفسية (الأنـــف أو الثغور التنفسية) ثم تمتص بالأماكن المختلفة للجهاز التنفسي حيث تســير مع تيار الدم لمكان تأثرها (الأعصاب -نظام إنزيمـــي خـــاص بعمليـــة التنفس)
- وقد يستخدم تيار هوائي متحرك air dynamic flow حيث يوضع الكـــائن بغرفة مزودة بتيار هوائي حيوي على مكية ثابتة ومعلومة التركيز مـــن المركب المختبر ويجب الأخذ في الإعتبـــار أن الســـمية الناجمـــة هـــي محصلة المسمية بالاستنشاق عن طريق الجهاز التنفسي وبالملامسة للجلد (أو الجليد)
- وهنا يلاحظ ارتباط مستوى التأثر بمستوى التركيز مع زمن التعريـض فإطالة مدة التعريض قد تفوق تعوض النفق في التركيز ويمكن أن يحـــل إحداها محل الأخر لإظهار العلاقة الخطية C.t=k

٤-التعاطى بالفم (Oral administration) :

بعد الفم هو المجرى الأكثر توقعا للسموم المعدية ذات الطبيعـــة الثابتـــة أمام العصارة المعدية الحامضية و المعوية القلوية حيـــث تمتـــص جزئياتـــه بكليهما كذلك ذات الطبيعية الغير مهيجة(Irritant) أو مقلصة (Convulsion) أو مقيئة (Vomiting)

وتتم المعاملة مع الثدييات كالفئران أو الأرانب بإدخال الجرعة المرغوبـــة

مخلوطة بزيت الذرة (Corn oil) أو زيت الزيتون (Olive oil) عن طريق أنبوب طويل من البلاستيك المرن والمثبت بنهاية محقن يحتوى على الجرعة خلال الفم مقر ليصل لمعدة الكائن المعامل بطريقة هادئة مع الضغط على عظمتى الفكين ليظل الفم مفتوحا وبعد إخراج الجرعة بالضغط على مكبس المحقن يتم فك الإنبوب عن المحقن حيث يملأ المحقن بالهواء ثم يوصل بالإنبوب ويضغط المكبس لإخراج ما تبقى من الجرعة بالإنبوب

وبعد الإنتهاء من المعادلة يتم مسك الحيوان من أذنيه فترة للتأكد من سريان الجرعة وعدم رجوعها لذا يفضل تجويع الحيوان لمدة تتراوح بين ٤-٦ساعة قبل المعاملة وهو ما يتيح أيضا عدم وجود كتل غذاء بالقناة الهضمية تعمل على تخفيض الجرعة بإمتصاصها عليها .

وقد يخلط المركب المختبر مع البيئة الغذائية (mixing with food) بالتركيز المطلوب وهذه الطريقة أقل دقة من السابقة لعدم إمكانية تقدير الكمية المأخوذة بالضبط كما يعيبها صعوبة تحضير وتجهز الوحدة المعادلة بطريقة متجانسة ١٠٠%

ويراعى تجويع الحيوانات قبل تقديم الغذاء لها ليتسنى سرعة تناول و بلع الوجبة بشراهة .

ويمكن استخدام هذه الطريقة مع الكائنات المتغذية على الحبوب أو الجلود أو الخشب أو الفراء أو السجاير حيث يخلط المركب مع هذه البيئات الغذائية بالتركيز المطلوب بمقارنة وزن الغذاء المعامل قبل وبعد التناول (التعريض) يمكن حساب كمية المركب المتناولة من خلال معرفة النسبة المضاف بها للبيئة الغذائية

التعاطي في صورة كبسولة (Capsules) حيث تحتوى كل كبسولة على الجرعة اللازمة من المادة السامة المختبرة والمخففة بزيت نباتي كزيت الذرة أو الفول السودانى أو البولى ايثيلين جليكول بحيث لا يزيد وزن المركب بالكبسولة عن ٢-٣ % من وزن الجسم حيث أن زيادة تعمل كملين فتفشل المعاملة .

أما طريقة السقي و الإرتشاف حيث يسقي الكائن المختبر المركب في

صورة ذائبة أو مستحلبة مع مياه الشرب أو تضاف للمحلول السكري بالنسبة المطلوبة للتغذية . وبتقدير حجم السائل قبل وبعد التغذية يتم تقدير حجم السائل المتناول و منة يتم حساب الكمية (حجم × تركز)

أما **طريقة الساندويتش** (**Sandwich Technique**) حيث توضع جرعة المركب المختبر (حجم × تركز) بين قرصتين من المادة الغذائية للكائن المختبر كقرصي عجينة البيئة الغذائية أو قرصين من ورق النبات مثلا ثم يقدم للتغذية لفترة ما ثم يتم حساب للمساحة المتناولة والمغذى علها وتطرح من المساحة الكلية للقرص قبل التناول فتحصل على الكمية المتناولة ولكن غالبا ما تكون غير دقيقة لصعوبة التحكم في انتظام وتجانس توزيع المركب في صورة فيلم منتظم .

ولاختبار الكائنات الثاقبة الماصة (Sucking & piercing) كالحشرات الطبية والبيطرية تجهز محلول المادة المراد إختبارها وتوضع في غشاء رقيق سهل الثقب لإدخال أجزاء الفم والتغذية علية وهنا يفضل تدفئة المحلول ليكن أكثر جذبا كما أن الدرجة سمك الغشاء و لونه و ملمسه ورائحته عوامل جذب لنجاح الاختبار أو قد تستخدم خلية (Clip on Cadge) ، شكل رقم (٣-٥) حيث يوضع بها عدد من الحشرات الثاقبة الماصة وتثبت فوق السطح النباتي المعامل ثم تفحص بعد فترة معينة.

شكل رقم (٣-٥) : شكل للخلية (Clip on Cadge) مثبتة علي السطح

٥-التعفير الدقيق (Precision dusting) :

وفيها تعرض الكائن المختبر لسحابة من المركب المختبر في غرفة أو قد يتم تعرض الكائنات المختبرة لمسحوق هذا المركب والمترسب على سطح ما تتحرك فوقه وغالبا ما تستخدم مع السموم اللامسة (Contact poisons) حيث يتم حساب كمية المترسب / وحدة .

ومتميز هذه الطريقة بسهولة أجرائها لكنها أقل دقة من حيث النتائج المتحصل عليها و قد نرغم على إستعمالها في حالة المركبات المختبرة بصورة مسحوق وهنا يجب مراعاة ألتصاق حبيبات المسحوق بجسم الكائن أثناء حركة علية .

٦-الرش الدقيق (Precision spraying) :

وهنا يستخدم برج الرش (Power tower) لمعاملة الكائن المختبر مباشرة أو معاملة بيئته الغذائية أو السطح الذي يعيش أو يتحرك علية عند ما يكون تأثير المادة المختبرة لامس و معدي (Contact & Stomach poison) نتيجة التلامس المباشر بين الكائن و مترسبات رش المركب المختبر على الجسم وعلى البيئة حيث يعد الرش بواسطة برج الرش أقرب طريقة لما يحدث في الطبيعة لكن مع إمكانية الحكم في كثير من العوامل كدرجة الحرارة أو الرطوبة خاصة في فترة ما بعد المعاملة كذلك عدد الكائنات المعرضة والجنس ونوع الطور المعرض والعمر وحجم قطرة الرش . وعند رش الكائن نفسه فإن كمية ما يتلقاه تختلف تبعاً لشكله الخارجي سواء أكان مستوى أو مقوس أو مكور أو مستقيم .

وينتج الرش هنا بأحجام متماثلة من فوهة مثبتة (nozzle) بأعلى قمة البرج و المتصلة بوعاء صغير يحتوى على حجم ثابت من التركيز المستخدم و المراد إختباره بينما يوضع الكائن أو السطح المعامل على المسرح (Stage) بقاعدة البرج أسفل فوهة الرش ويحاط بأنبوب اسطواني ناعم الملمس له خصر في الوسط لتلاشي أثر التجمع للقطرات ما أمكن وعند تشغيل طلمبة الهواء يرتفع المسرح لأعلي ليقفل الفتحة السفلي للاسطوانة وعندها تبدأ فوهة الرش في العمل حتى يتم تذرير الحجم الموضوع فيتوقف تلقائيا ضغط الهواء

ويلاحظ هنا أن قطرات الرش تكون ذات توزيع منتظم وتغطية جيدة .

كما يلاحظ أنه عند تعرض الكائن للرش يكون لدراسة السمية بالملامسة ولكن لا يمكن إغفال الأثر التنفسي بجانب الأثر اللامس ، أما عند تعريض البيئة الغذائية للكائن للرش فإنه يعطى دراسة السمية المعدية (Stomach poison) .

والتقييم الحيوي بهذه الطريقة أقل دقة لعدم تحديد الكمية الملتقطة من المركب المختبر وعدم الإلمام بالظروف المحيطة وقت إلتقاط المركب والمؤثرة بدورها على نشاط الكائن المختبر .

وعند تعريض الكائنات الدقيقة النشطة فإنه يتم وضعها بحجرة سلك (قفص) بأبعاد تلائم وحجم المسرح يوضع بها الكائن المعامل كالذباب أو البعوض و بعدد معين وليكن عشرة حيث يتم عد الأفراد التي صدمت أو صرعت (Knock down) بعد الرش في حالة المركبات المختبرة ذات التأثير السريع (الصرع) أو تحفظ ويتم عد الميت عند الفحص يوميا .

ويلاحظ أنه إذا طالت مدة التعرض لفترة أطول عن ١٢-٢٤ ساعة فإن التعرض هنا يكون للمركب وممثلاته .

ولتقدير كمية مترسبات الرش / وحدة المساحة يتم وضع شريحة زجاجية ذات أبعاد معلومة بدلا من الكائن أو بيئته الغذائية على المسرح ثم تجرى عملية الرش (المعاملة) وعقب الرش مباشرة يتم وزن الشريحة الزجاجية ومنها يتم معرفة كمية المركب المختبر أو باستخلاصها ثم تقديرها كميا بأحدي الطرق اللونية أو الإنزيمية و بكل الحالتين يمكن تقدير كمية الرش / وحدة المساحة .

أمثلة للتقييم الحيوي لكائنات مختبرة مختلفة ومركبات سامة متنوعة :

١-التقييم الحيوي لسموم نيماتودية :

عند التقييم الحيوي لمركب نيماتودي سام أقترح التدرج التالي لقياس الفاعلية البيولوجية خاصة للنيماتودا التي تعطى مظهر إصابة في شكل تتدرن:

المرتبة ١ : لا توجد مظاهر للإصابة بعد المعاملة
المرتبة ٢ : الجذور عليها درنات صغيرة كثيرة العدد
المرتبة ٣: الجذور عليها درنات كبيرة قليلة العدد
المرتبة ٤ : الجذور عليها درنات كبيرة وكثيرة العدد
المرتبة ٥ : الجذور كلها متدرنة لشدة الإصابة ولضعف المركب أو التركيز المستخدم منه

وتكون النسبة المئوية المعدلة للإصابة (الأعراض أو الضرر) =

$$\frac{\text{عدد العينات لكل مرحلة} \times \text{القيمة العددية للمرحلة} \times ١٠٠}{\text{العدد الكلى للعينات}}$$

٢-التقييم الحيوي لمبيدات الحشائش (Herbicide bioassay) :

يعتمد التقييم الحيوي لمبيدات الحشائش على درجة تأثيرها المباشر سواء على مرحلة الإنبات أو ما بعد الإنبات (Post emergence) وظهور البادرات أو معادلة البادرات أو ما بعد البادرات حيث يتم التقييم الحيوي لها في وجود نباتات والحشائش ذات الفلقة الواحدة أو الفلقتين .

يلي ذلك إجراء الاختبار على الأثر المتبقي المركب أي نبات المركب في التربة بصورة نشطة ولفترة زمنية .

ويحتاج التقييم للعديد من التجارب المعملية ثم الحقلية قبل الحكم على نوعية تأثير المركب والطريقة الممكن استخدامه والتركيز الموصى به حتى

لا تحدث تأثيرات جانبية على النبات أو التربة والكائنات كذلك يجب دراسة سلوك المركب عقب وصوله التربة (هدم -امتصاص-إدمصاص-غسيل بماء الري أو المطر أو الندى الشديد أو البخر والهدم الضوئي و الحيوي والكيميائي أو نتيجة العمليات الزراعية .

ويمكن التعرف على الأثر المتبقي (Residual effect) بالطرق الآتية :

٢-١-طرق حيوية (Biological methods) :

حيث يؤخذ على الأقل عشرة عينات من أجزاء مختلفة من التربة وبعمق ثابت تخلط جيدا لتكوين عينة مركبة (Composes) تجفف بالهواء ثم تقسم لعدة مكررات في أكواب بلاستيك (١٠٠جم) مثقبة من أسفل ويوضع لكل منها عدد ثابت من بذور الشوفان وتزرع على عمق مناسب وتروى (وهو نبات حساس لمركب السيمازين و الأترازين و مركب IPC و مركب CIP) كذلك يعد نبات فول الصويا حساس للاترازين واليوريا

وبعد ثلاثة أيام من الإنبات تخف النبات بكل أصص لعدد ثابت ثم تربى تحت ظروف بيئة مثلى من حيث الري ودرجة الحرارة والضوء . ويكرر ما سبق ولكن في تربة خالية من المركب المختبر.

ويتم عمل منحنى قياس يربط بين التركيزات المتدرجة من المركب المختبر وبين الوزن الجاف للبادرات ومنها يمكن التعرف على كمية المركب الموجود بكل كوب و بالتالي حساب كمية المركب / فدان (فدان تربة و بعمق ١٠ سم = ١,٥ مليون رطل .

٢-٢-قياس حركة وغسيل المركب بقطاع من التربة :

بعض المركبات قابلة للغسيل لزيادة معدل ذوبانها في الماء وقلة ادمصاصها بحبيبات التربة سواء بمياه الري أو المطر فتقل فاعليتها بالطبقة السطحية لتشربها وتحركها للإعماق .

تزداد قابلية المركب للغسيل بالأراضي الرملية > الخفيفة > الثقيلة > الطينية > الطينية المحتوية على مادة عضوية .

حيث تؤخذ كمية معلومة من التربة وتوضع في عمود زجاجي بطـــول ٣٠سم وقطر ٢٤سم ويملأ إلى ٣/٤أرتفاعه بالتربة ويقفل من أســفل بغطـــاء وتخرج منه صنبور أعلاه صوف زجاجي .

ثم يوضع تركيز من المركب المختبر (٠,١جم) بسطح العمـــود وبعـــد إذابته بقليل من الماء يضاف إليه ٥٠٠ ملل ماء / خمس دفعات كـــل منـــها ١٠٠ملل على فترات مع فتح الصنبور السفلي لإستقبال الرشح الـــذي يحلـــل كيماويا .

ينتزع غطاء الكاوتشوك وتستقبل التربة بنفس هيكلـــها وتقســم لثـــلاث طبقات يوضع كل منها بكوب للتقدير الحيوي و الكيمياتي .

٣-التقييم الحيوي لمبيدات العناكب (Acaricide bioassay) :

حيث تستخدم العناكب من عائلة (Fam. Arachnidae) كـــأداة للتقييـــم الحيوي للسموم الموصى بها

حيث يؤخذ ٥٠-١٠٠ عنكبوت / معاملة وتزداد إلى ١٠٠ عند التقييـــم الحيوي بغرض المفاضلة والتصفية (Screening) بين عـــدة ســـموم لاختيـــار أقواها و أفضلها .

ويتم الفحص والعد بطريق :

- الطبع (توضع الورقة النباتية التي عليها العناكب المحتوية بين قرصيـــن الورق الأبيض ثم الضغط عليها بإستواء فيترك كل فـــرد بصمـــة مكانـــه بالورقة البيضاء)
- أو تعامل الورقة بأبخرة الإيثيلين داى كلوريد ثم تجمع الأفـــراد الميتـــة بسهولة بفرشاة وتجميع وتعد
- أو يتم شفطها بشفط الهواء حاملة إياها لقارورة صغيرة ثم تعد

ويمكن أثناء العد تميز الأطوار المختلفة لبيان أثر المركـــب علـــى كـــل طور على حدة .

٤-التقييم الحيوي للسموم الفطرية (Fungicides bioassay) :

يتم التقييم الحيوي للمبيدات الفطرية من خلال مسارين من الطرق :

٤-١-طرق معملية :

توجد طرق معملية للتقييم الحيوي للسموم الفطرية (Basic Fungitoxicity) تجرى معمليا أو بالصوب لمعرفة التأثير السام (الفاعلية) أو المفاضلة بين عدة مركبات يراد استخدام أحسنها في عملية المكافحة التطبيقية

٤-١-١-من حيث التأثير على إنبات الجراثيم (Spore Germination) :

حيث تطرأ عدة تحويرات تطويرية على هذه الطريق لتناسب وتلائم نوعيه جراثيم الفطر وظروف التجربة .

٤-١-١-١-إنبات الجراثيم على شرائح زجاجية(Slide spore germination) :

فبعد جفاف مترسبات الرش على الشريحة يضاف إليها نقطة من معلق جراثيم الفطر المائي ثم تحضن لفترة مناسبة بعدها يتم تقدير النسبة المئوية لإنبات الجراثيم النامية .

أو قد يخلط المحلول المحتوى على الجراثيم مع محلول المركب المختبر مع المادة المغذية بأنبوب اختبار وترج جيدا ثم تؤخذ منها نقطة أو أكثر وتفرد وتحضن في أطباق بترى ثم تقدر النسبة للإنبات وتفضل هذه الطريقة مع الفطريات التالية :

Monilinia frocticola
Alternaria solani
Glomirella cingulata
Stepnphelium carcinaform

حيث تحسب النسبة المئوية لقتل الجراثيم و الميسيليوم في فترة قصيرة وليس وقف النمو (Fungi static)

٤-١-١-٢-تقيم السموم الفطرية الغازية كالميثيل بروميد Methyl bromide

وفيه يتم تعريض الجراثيم وهى على ورق ترشيح أو شريحة زجاجية لجرعات مختلفة من الغاز السام وتتوقف مقدرة النشاط الإبادي للغاز السام على مقدرته علي إختراق وتخلل الجرثومة حيث تقدر بعد ذلك النسبة المئوية لإنباتها أو يستخدم معلق الجراثيم في بيئتها الغذائية لإتمائه ثم يمرر فيه الغاز السام وهنا تتوقف مقدرته على الذوبان بالمعلق .

٤-١-١-٣-إنبات الجراثيم على طبق آجار (Agar plate germination) :

حيث تجهز أطباق أجار تحتوى على المركب السام المراد تقيمه بتركيزات مختلفة ينمى عليها جراثيم الفطر وبعد فترة تقدر النسبة المئوية للإنبات

٤-١-١-٤-إنبات الجراثيم بدوارق مثبتة بهزاز (Shaker flask germination)

حيث يقدر النشاط الإبادى للمركب المختبر لإنبات الجراثيم في دوارق مثبتة بهزاز مضاف إليها الجراثيم والبيئة الغذائية ، وتتميز هذه الطريقة بالتحكم في درجة الحموضة والتهوية .

٤-١-١-٥-انتفاخ الجراثيم (Spore volume) :

فعند وضع جراثيم *Myrothecium spp* بمحلول يحتوى على الخميرة و السكروز فإنها تنتفخ ويصبح حجمها خمسة أضعاف على مدى ثلاث ساعات / ٣٠م وتستخدم هذه الظاهرة في تقيم النشاط الإبادى بإضافة تركيزات مختلفة من المركب السام وملاحظة مدى الإنتفاخ .

٤-١-٢-تأثيرها على النمو الفطري (Fungus growth) :

٤-١-٢-١-طريقة النمو الشعاعي (Radial growth technique) :

وفيها يتم خلط المركب السام بالتركيز المطلوب مع بيئة الآجار السائلة

ثم يصب بأطباق بترى تتم عدوتها بمركز الطبق (بعد تجمدها) بـأجزاء مـن الفطر أو الميسليوم أو كليهما .

وهنا يتخذ النمو الهيفى كمقياس لتقدير النشاط الإبادى عند تقدير الزمـن اللازم ليصل الفطر لقطر محدد (لوجود علاقة خطية بين النمو الإشـعاعى للفطر والزمن) .

وهنا تقاس السمية النسبية للفطر (Relative Fungitoxicity) بأنـها أقـل تركيز من المركب لا يحدث عنده نمو هيفى للفطر وتكون :

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{قطر النمو بالكونترول (A)} - \text{مثيله بالمعامل (B)}}{\text{قطر النمو بالكونترول (A)}} \times ١٠٠$$

٤-١-٢-٢-المزرعة الدائرية (Roll culture) :

حيث يوضع الآجار السائل مع تركيزات مختلفة مـن المركـب السـام المختبر وجراثيم أو هيفات الفطر فى زجاجات صغيرة وتلف بسرعة حـول محورها فيتجمد الآجار على جوانب جدرانها.

وهنا يتخذ النمو الهيفى كمقياس لتقدير النشاط الإبادى عند تقدير الزمـن اللازم وتقاس السمية النسبية للفطر (Relative Fungitoxicity) بأنها أقل تركيز من المركب لا يحدث عنده نمو هيفى للفطر

٤-١-٢-٣-أقراص ورق الترشيح(Paper disk technique) :

وتستخدم مع الفطريات المتكاثرة بالجراثيم أو الـهيفات ولكـن يعيبـها احتياجها لفترة طويلة حيث تؤخذ النتائج وبطريقة +،- كل ٢٤ ساعة ولمـدة ٧-١٠ يوم .

كذلك تحتاج لخبرة لمعرفة سرعة النمو وقطر المستعمرة خاصـة وأن النمو يكون موجود بقلة مع أن التركيز المستخدم يكون قليل جـدا ولـهذا لا تنجح إلا مع الفطريات المرباه على بيئات صناعية وتحضر بـأخذ ٢٠٠جـم بطاطس يضاف إليها ٥٠٠ ملل ماء ثم ١٥جم سـكر دكسـتروز وتطبـخ

المحتويات لمدة ٣٠ دقيقة ثم تبرد ويضاف إليها ١٠ جم آجار وتعقم لمدة ٣٠ دقيقة بالأوتوكلاف . ثم تجهز أوراق ترشيح بقطر ١٢-١٣ سم ويضاف إليها تركيز المادة المختبرة ثم يوضع القرص على سطح الطبق البترى المملوء بالأجار (PAD) ثم يغطى بمعلق الجراثيم أو الهيفات بمركز كل قرص وتسجل النتائج بقياس منطقة عديم النمو (التثبيط) حول قرص الورق فيدل على فاعلية المركب والمتوقفة على مدى تأثير المركب ومعدل ذوبانه وانتشار بالأجار .

ويحسب التركيز الذي يعطى أقصى تثبيط (Max. Inhibition Concentration : MIC) بأنه التركيز الذي لا يعطى نمو فترة ٧-١٠ كمقياس لمقارنة تركيزات السموم المختلفة .

٤-١-٢-٤-طريقة منطقة التثبيط (Zone of inhibition) :

وفيها يخلط معلق الهيفات أو الجراثيم مع البيئة ، أما التركيزات المختلفة من المركب السام فيوضع بأنبوبة اختبار زجاجية قصيرة مفتوحة الطرفين بمركز الطبق وبعد التحضين يقاس قطر النمو .

٤-١-٣-من خلال تأثيرها على معدل التنفس (Respiration rate) :

حيث يقدر تأثير المركب المختبر على معدل التنفس بالإنخفاض أو التثبيط أثناء نمو الفطر حيث يتم تقدير ثاني أكسيد الكربون أو الأكسجين فيعطى مؤشر دقيق وسريع خاصة بالسموم الموقفة لنمو الفطر(Fungi static).

٥-التقييم الحيوي لمانعات التغذية (Anti feedant bioassay):

يتم التقييم الحيوي لمانعات التغذية من خلال اختبارات معملية تحت ظروف قياسية بهدف دراسة التأثير البيولوجى السام (الإبادى) للمركب المختبر على الكائن المستهدف موضع الاختبار . ويتم ملاحظة سلوك الكائن (Behavioral studies) عند تقديم الغذاء المفضل له قبل وبعد المعاملة بإحدى

المركبات ذات التأثير المانع للتغذية من حيث الإقتراب أو الإبتعاد عن العائل المفضل المعامل .

كذلك تتم ملاحظة الاستجابة للقضم (Biting responsc) وعددها وشدتها (Biting number &Intense)

كذلك تجرى دراسات قياسية على :

- حساب كمية الغذاء المستهلك سواء أكان ذلك من خلال حساب مساحة المقطع المتغذي عليه أو من خلال وزن الكمية المأخوذة / وحدة الزمن
- حساب كمية الفقد في وزن جسم الكائن / وحدة الزمن
- حساب عدد كرات البراز / كائن أو المتوسط / لعدد الكائنات
- حساب نمو الكائن (وزن-قياس أطوال) خاصة قياس علبة الرأس (Head capsule)
- قياس التأثير على عامل الخصوبة (عدد البيض الموضوع من الإناث وعدد الكتل وكثافة البيض بكل كتلة ومعدل التنفس وحيوية البيض كدليل على حيوية ونشاط الذكور)
- الفترة الزمنية بين الطور و الذي يليه .
- ملاحظة الشكل المورفولوجى لكل طور .

وتختلف طريقة المعاملة بمانعات التغذية بإختلاف :

- نوع أجزاء الفم بالكائن المختبر فالكائنات القارضة يفضل معاملة عائلها المفضل أو معاملة الغذاء الجاف الخاص بها كالدقيق أو النخالة كما بالجراد أو بخلط المركب مع مكونات البيئة الغذائية والمشهية بإضافة السكروز وتقدم طازجة أو بمعاملة ورق الترشيح بشكل أقراص صغيرة أو باستخدام شرائح خاصة
- نوع أجزاء الفم بالكائنات الماصة (Piercing) حيث تستخدم معها المركبات ذات التأثير الجهازي لمعاملة العائل المفضل .أو بإضافة المركب لمياه الشرب أو إضافته لمكونات البيئة الصناعية السائلة .

ويفضل أن يكون الاختبار إختيارى فلا يحدث الكائن المختبر شيء

لتناوله خاصة إذا ما كانت وحيدة العائل (Monohost) .

١ - **طريقة القرص الورقي الغذائي (Leaf Disk Method) :**

فيختار أفضل العوائل للكائن المختبر المستهدف ثم تختار أفضل أجزاؤه كالورق الطري الطازج ويتم عمل أقراص منه بجوار حواف الأوراق وبعيدا عن منطقة العروق لكثرة محتواها العصيري .

تغمر هذه الأقراص لفترة محدودة في محاليل التركيز المختبرة للمادة المانعة موضع البحث وتقيم حيويا . كما تغمر أقراص أخرى مماثلة في المذيب فقط ككونترول ثم تجفف الأوراق بتركها لفترة في الهواء العادي (لا يفضل استخدام تيار هوائي من مروحة مثلا حتى لا يؤدى لخفض في تركيز المركب بعد جفافه بهيئته قشور).

تقدم الأقراص للتغذية ويفضل تجويع الطور المتعدى لمدة لا تقل عن ٢ ساعة .

بعد التغذية يتم قياس متوسط مساحة الأقراص المتبقية ثم نطرح من مساحة القرص الكاملة فنحصل على الكمية المستهلكة في التغذية من كل قرص بكل تركيز

معدل التغذية (Feedant rate . FR) =

$$\frac{\text{مساحة القرص} - \text{مساحة الجزء المتبقي بالمعامل} \times ١٠٠}{\text{مساحة القرص} - \text{مساحة الجزء المتبقي بالكونترول}}$$

معدل منع التغذية Antifeedant Rate= ١٠٠ - %معدل التغذية (FR)

معدل استهلاك التغذية = معدل التغذية / عدد الكائنات بالقرص الواحد

و كمثال لذلك ففي تجربة لتقييم مانع تغذية بطريقة القرص كانت متوسط مساحة القرص النموذجي هو ٨,٨٥ سم٢ ووضع ١٠ كائنات مختبرة معا على كل قرص وبعد ٢ ساعات أخذت الأقراص وتم حساب متوسط التغذية فكانت كما يلي :

التركيز	مساحة قرص الورق
بدون معامله	١٠-٢ سم٢
٣,١٥	٢,١١ سم٢
٦,٢٥	٣,٥٠ سم٢
١٢,٥٠	٤,٤٧ سم٢
٢٥,٠٠	٥,٥٨ سم٢
٥٠,٠٠	٦,٨٠ سم٢
١٠٠	٧,٩٠ سم٢

ولحساب معدل التغذية (FR) ومعدل مانع التغذيــة (AFR) ومعــدل إستهلاك الكائن (معدل التغذية FR = مساحة القرص - مساحة المتبقــي ÷ مساحة المتبقى بالمقارنة × ١٠٠) كما بالجدول التالي :

التركيز PPm	مساحة القرص سم٢	معدل التغذية Feeding rate	معدل منع التغذية AFR	معدل استهلاك / الكائن
٠.٠	٢,١٠	٨,٨٥-٢,١/٨,٨٥-٢,١x ١٠٠=	-	-
٣,٣٥	٢,١١	%٩٩.٨	% ٠.٢٠	% ٩.٩٨
٦.٢٥٠	٣,٥٠	%٩٧,٠٠	% ٢١,٠	% ٧.٩
١٢,٥٠	٤,٤٧	%٦٤,٠٠	% ٣٥,٢	% ٦,٤٨
٢٥,٠٠	٥,٢٨	%٥٢,٨٠	% ٤٧.٢	% ٥.٢٨
٥٠,٠٠	٦,٢٨	%٣٠,٠٠	% ٧٠,٠	% ٢.٠
١٠٠,٠٠	٧.٩٠	%١٤,٠٠	% .٨٦٠	% ١,٤

٢-طريقة وزن الكائن المختبر قبل وبعد التغذية :

نختار أفضل العوائل للكائن المستهدف المفضل له فى التغذية ثم نختــار أفضل أوراق النبات الغضة الخضراء .

ويتم عمل أقراص من حواف هذه الأوراق بعيدا عن منطقـــة العـروق لكثرة محتواها العصيرى

وتغمر هذه الأقراص لفترة محددة في محاليل التركيزات المختلفة للمــادة

المختبرة المانعة للتغذية كما تغمر أقراص أخرى مماثلة في المذيب فقط مع المادة المانعة كالكونترول ثم تترك لتجف بالهواء العادي وبدون استخدام مروحة حتى لا تتقشر متبقيات المركب وتتطاير ويحدث فقد بالتركيز و يتم تجويع الطور المتغذي من الكائن المختبر لمدة لا تقل عن ٧ ساعات ثم يوزن وبدقة ثم تقدم له الأقراص للتغذية عليها و هي الأقراص المعاملة بالمركب و المعاملة بالمذيب و التي بدون معاملة و بعد التغذية يتم إعادة وزن الطور المتغذي بالأقراص المعاملة والغير معاملة . ثم تحسب :

- % للتجويع (Starvation) =

الفرق في الوزن قبل وبعد بالكونترول - الفرق في الوزن قبل وبعد بالمعامل × ١٠٠
الفرق في الوزن قبل وبعد بالكونترول -الفرق في الوزن قبل وبعد بالصائم

- % لمعدل المنع أو الحماية (Protechtion) =

مساحة الورق قبل المعاملة - مساحة الجزء المستهلك بعد المعاملة × ١٠٠
مساحة الورق قبل المعاملة

- معدل الاستهلاك Consumption =

مساحة الجزء المستهلك - مساحة الورق قبل المعاملة × ١٠٠

و كمثال لذلك ففي تجربة لتقييم مانع تغذية بخمس تركيزات مختلفة هي : ١٢,٥، ٢٥،٥٠،١٠٠،٢٠٠ واستخدام لكل تركيز ٢٥ كائن مختبر وتم وزنها قبل وبعد التجربة وكان الفرق في الوزن هو ٥٠,٧٢ ، ٤٧,٣٣، ٤٢,٦٢ ، ٣٤,٧٨ ، ٣٠,٤٩ وكان فرق متوسط الكونترول ٥٢.٠٥ و بالأفراد الصائمة ١١,٣٦ و لحساب % التجويع .

التركيز (ppm)	الفرق في الوزن	% التجويع
١٢,٥	٥٠,٧٢	% ٢,٠٨
٢٥,٠٠	٤٧,٣٣	% ٧,٤٠
٥٠,٠٠	٤٢,٦٢	% ١٤,٨٠
١٠٠,٠٠	٣٤,٢٨	% ٢٧,٩٠
٢٠٠,٠٠	٣٠,٤٩	% ٣٣,٨٠

- % للتجويع =

الفرق في الوزن قبل وبعد المقارنة - الفرق في الوزن قبل وبعد بالمعامل × ١٠٠
الفرق في الوزن قبل وبعد المقارنة -الفرق في الوزن قبل وبعد في الصائم

٦-التقييم الحيوي باستخدام المعقمات الكيماوية (Chemosterilants bioassay)

تختلف طرق التقييم الحيوي للمعقمات على نوع الكائن المختبر ونوعية المادة المعقمة المختبرة وطريقة تغذية الكائن والطور المستخدم ومن هنا تنوعت طرق المعاملة :

٦-١-طريقة التغذية (Feeding Method) :

حيث تحضر التركيزات المختلفة من المعقم المختبر المراد تقيمه حيويا ثم توضع كل ذكر و أنثى من الكائن البالغ المختبر ببرطمان زجاجى مغطى فوهته بسلك أو بشاش ثم تجهز مادة التغذية لتعطى أعلى كفاءة تناسلية ثم يضاف إليها التركيز من المعقم موضع الاختبار

تترك ٢٤ ساعة حيث يتم استبداله وتغيره بأخر لا يحتوى على المعقم لوضع البيض وتترك فى الظلام لتنبيه عملية التلقيح .

% الفقس (Hatchability) = عدد البيض الفاقس / عدد البيض الموضوع × ١٠٠

%للعقم (معدل العقم) (Sterility rate) = ١٠٠-% الفقس =

%للعقم بالمعامل -%بالمقارنة / ١٠٠ - % بالمقاومة × ١٠٠

%للعقم المصححة = %للعقم بالتركيز الثاني - % للعقم بالتركيز الأول / ١٠٠ - % للعقم بالتركيز الأول × ١٠٠

% للكفاءة التناسلية (Fecundity) = عدد البيض الفاقس بالمعامله / عدد البيض الموضوع بالكونترول × ١٠٠

-عدد البيض الموضوع بالمقارنة - عدد البيض الفاقس بالمعامل / عدد البيض الموضوع بالمقارنة × ١٠٠

% التناقص فى الكفاءة التناسلية = ١٠٠ - % الكفاءة التناسلية

الاقتدار التناسلى (Reproductive Potential) =

عدد البيض الفاقس بالمعامل-عدد البيض الموضوع بالمعامل / عدد البيض الفاقس بالمقارن -عدد البيض الموضوع بالمقارن × ١٠٠

حد الأمان (Safety level SF1) : LD_{50} / SD_{50}

فإذا كان الناتج يساوي ٥ أو أكبر من ٥ تقبل المادة كمعقم .

و يلاحظ أن :

LD_{50} : تستنتج من عمل خط سمية للمادة المختبرة كمعقم .

SD_{50} : تستنتج من عمل خط عقم للمادة المختبرة كمعقم .

٦-٢-طريقة الساندويتش (Sandwich technique) :

و فيها يتم عمل تركيزات متدرجة من المعقم المختبر و يوضع بين قرصين من الورق يحاط محيطهما بعجينة بكتين (١جم بكتين +٥جم سكر + كمية من الماء تكفي للعجن) و توزع الأقراص في برطمانات بكل منها ذكر و أنثي وهكذا كما سبق ترفع الأقراص بعد يوم و يوضع محلها بديل غير معامل لمدة ساعة ثم تعاود الأقراص مرة أخري ويتم حساب أثر المعقم علي :

النسبة المئوية للفقس =

النسبة المئوية المصححة للعقم =

النسبة المئوية للكفاءة التناسلية =

النسبة المئوية للنقص في الكفاءة التناسلية =

النسبة المئوية للإقتدار التناسلي =

حد الأمان (SF1)

٦-٣-طريقة المتبقيات (Residue technique) :

و تتم بوضع حجم معين من كل تركيز من المادة المعقمة و المراد تقييمها حيويا في طبق بتري و يدار حتي تمام توزيع هذا الحجم علي القاعدة بشكل منتظم و تترك لتجف . ثم توزع الكائنات موضع الإختبار بالعدد المناسب بكل طبق ثم تغطي بشاش أو سلك شبك ويتم حساب أثر المعقم علي :

النسبة المئوية للفقس =

النسبة المئوية المصححة للعقم =

النسبة المئوية للكفاءة التناسلية =

النسبة المئوية للنقص في الكفاءة التناسلية =

النسبة المئوية للإقتدار التناسلي =

حد الأمان (SF1)

و كمثال في تجربة معملية استخدم المعقم Tepo وبتركيزات ٠,٥،١،٠،٢،٤،٨ فكان عدد البيض الموضوع هو ، ، ، ، ، ، على الترتيب .

احسب % للنقص فى الكفاءة التناسلية لكل تركيز ،% للنفس اذا كان عدد البيض بالمقارنه ٢٧٣٠ % المصححة للعقم واحسب قيمة SD50

التركيز	عدد البيض الموضوع	عدد البيض الفاقس	% الكفاءة التناسلية	%النقص في الكفاءة التناسلية	% للفاقس	% للعقم	% المصحح
٠,٠	٢٧٠٥	٢٥٥٧	–	–	٩٥	٥	٢
٠,٥	١٨٢٢	١٤٢٧	٦٧	٣٣	٧٨	٢٢	٨
١,٠	١٤٢٠	٨٩٧	٥٣	٤٧	٦٣	٣٧	٣٤
٢,٠	١٣٢٧	٨٠٢	٤٩	٥١	٦٥	٣٥	٣٢
٤,٠	١٢٨٧	٤٢٣	٤٨	٥٢	٣٢	٦٨	٦٦
٨,٠	٨٨٩	١٨٠	٣٢	٦٨	٢٠	٨٠	٧,٩

الكفاءة التناسلية= عدد البيض الموضوع بالمعامل ÷ عدد البيض الموضوع بالكونترول× ١٠٠

= عدد البيض الموضوع بالمقارنة – عدد البيض الموضوع بالمعامل ×١٠٠

%النقص فى الكفاءة التناسلية = ١٠٠ – الكفاءة التناسلية

% التعقيم = عدد البيض الفاقس ÷ عدد البيض الموضوع × ١٠٠

%العقم = ١٠٠ – الفقس

التقييم الحيوي لتقدير الجرعة القاتلة للنصف :

يجري التقييم الحيوي لمركب سام بهدف تقدير الجرعة القاتلة للنصف (LD 50 ، Lethal Dose 50) أي الجرعة اللازمة لقتل خمسون في المائة من عدد أفراد مجموع معين عند التعرض لها مرة واحـــدة (Single dose) و تمـــيز بالمليجرام / كجم من وزن جسم الكائن الحي المختبر .و تستخدم لذلك طريقـة Sperman-Karber لتقدير معدلات الإستجابة (Rate of Responses) من صفر إلـي مائة في المائة إستجابة (موت) وهنا تقدر:

- نسبة الإستجابة الصغري أو الدنيا و الناجمة عن إستخدام أقل تركـــيز أو جرعة (Minimal Lethal Dose 00.00) أي الجرعـــة أو التركـيز الـذي يعطي معدل إستجابة أو موت يساوي صفر .
- نسبة الإستجابة القصوي أو العليا و الناجمة عن إستخدام أعلي تركـيز أو جرعة (Maximal Lethal Dose 100.00) أي الجرعة أو التركـــيز الـذي يعطي معدل إستجابة أو موت يساوي ١٠٠% و أي زيـــادة فـــي قيمـــة التركيز لا تؤدي إلي زيادة في النسبة المئوية للموت .
- تقدير معدلات الإستجابة لعدة جرعات وسطية بين هاتين الجرعتيـــن و بفروق متساوية لوغارتميا . حيث يتم تقدير الجرعة تبعا لوزن الكائن الحي المعامل و هنا يتم عمل محلول قياسي للمركب المختبر و ذلك بأخذ وزنـــة بدقة ثم إذابتها في مذيب مناسب و الذي يجب إختبار سميته أيضا و تقديـــر نسبة الإستجابة لكمية المذيب المستخدم و الداخلة فـــي تجـــهيز التركـــيز المستخدم لطرحها من نسبة الإستجابة الكلية و بالتالي يتسني ملاشاة تـــأثير المذيب إن وجد له تأثير . يتم بعد ذلك عمل عدة تخفيفات (Dilutions)مـــن المحلول القياسي السابق لإستخدامها في المعاملة .

حيث يتم حساب كمية المركب اللازمة لحقن الكائن ذو الوزن المعلـــوم من خلال :

الجرعة (ملليجرام / كجم) X وزن الكائن الحي /١٠٠٠ ملليجرام /كجم

ثم يحدد الحجم الموجود فيه هذه الكمية من المركب السام في محلـــول ٥% علي سبيل المثال :

ثم يحدد الحجم الموجود فيه هذه الكمية من المركب السام في محلـول ٥% على سبيل المثال :

= ملليجرام/كجم X ١٠٠ /١٠٠٠ X ٥ ملليجرام /حيوان / جم

وفى حالة المركبات السامة المختبرة الغير نقية تراعى نسبة النقاوة وعمل:

تصحيح للتركيز المستخدم = الوزنة الملخوذة × ١٠٠ / % للنقاوة

فعلى سبيل المثال يراد حقن فار وزنه ٣٠ جم بمركـــــب المـــالاثيون ٥٠% وبجرعة مقدارها ١٠ مللجرام / كج

الجرعة المطلوبة ١٠ مللج من المركب / ١٠٠٠ جم من وزن الكائن

كمية المركب اللازمة لحقن فار ٣٠ جم =

٣٠×١٠/١٠٠٠ = ٠,٣ مللج / فار وزنه ٣٠ جم

وبما أن تركيز المركب ٥٠% :

الحجم الموجود فيه ٠,٣ مللج = ٠,٣ × ١٠٠/ ١٠٠٠ × ٥ = ٠,٠٠٠٦ ملل

٤. تحقن كل جرعة من مستويات (جرعات) التجريع في الكائن الحي تبعـا لوزنه مع عدد المكررات اللازمة وذلك بعد تجويعها حتى يقبل الكائن علـــى الطعام ولا يرجعه في حالة التعاطي عن طريق الفم (Oral administration) في نفس الوقت تكون القناة المعد معوية خالية من كتلة الغذاء و التي قـــد تعمـــل على تخفيف الجرعة لامتصاص كمية منها .

٥. يتم فحص الكائنات المختبرة بعد المعاملة وتسجيل الظواهـــر التأثيريـــة وعدد الكائنات الميتة بعد ٢٤ ساعة من المعاملة بكل معاملة والمقارنة وذلـــك بهدف تصحيح نسبة الموت من خلال استخدام معادلة أبوت:

= % للموت فى المعامل – %للموت بالكونترول × ١٠٠/

١٠٠ – % للموت الكونترول

٦. تقدر الجرعة المميتة الوسطية القاتلة للنصف :

M = k× (الجرعة القاتلة ١٠٠%) +½ لو d(ثابت الفترات) –مج r/n(العدد الكلى للموت).d

يقدر قيمة اللوغاريتمي للجرعة القاتلة للنصف $(Vm) = (n2(n-1) / d^2) -$ مج $r\ (n-r)$.

يقدر الخطأ القياسي(Standard error) على مستوى SE_m ٠,٠٥ $= Vm^{1/2}$ ∴ SE±m (٠,٠٥)

تقدر حدود الثقة العليا والدنيا (Confidence limits) والمتوقـــع أن تقـع قيمـة الجرعة القاتلة للنصف بينها وبدرجة احتمال ٩٥% ، ٩٩%

لو $F_{٩٥\%}$ = ٢,٧٧ / N(عدد الكائنات المختبرة بين LD_{84}-LD_{16}). لو S

لو $F_{٩٩\%}$ =٣,٦٤١ N(عدد الكائنات المختبرة بين LD_{84}-LD_{16}). لو S

حدود الثقة العليا = $LD_{50}.F$ حدود الثقة الدنيا = $LD_{50} \div F$

و يتم تصحيح نسب الموت المبدئية المتحصل عليها من تجارب التقييـــم الحيوى مباشرة و التي لا تصلح للتحليل الإحصائى إلا بعد تصحيحها مقارنـة بنسب الموت الطبيعي الموجودة في الكونترول بإحدى المعاملات التالية تبعـا لنوع التجربة :

النسبة المئوية المعدلة للموت بمعادلة ابوت =

%للموت المعامل -%للموت بالكونترول ÷ ١٠٠ - % للموت بالكونترول × ١٠٠

النسبة المئوية (Handerson &Tilton) =

١-[(العدد بعد المعاملة) (العدد بالكونترول قبل المعاملة) / (العدد قبل المعامله) (العدد بالكونترول بعد المعاملة)] × ١٠٠

النسبة المئوية Sun &shephard =

(%للموت بالمعامل + %للتغير فى الكثافة العددية قبل وبعد المعاملة) / ١٠٠ + التغير فى الكثافة العددية قبل وبعد المعاملة × ١٠٠

والمعادلة الأخيرة تفيد مع الكائنات سريعة التكاثر والتي يتضاعف عددها عدة أضعاف في يومين أو ثلاثة

فعند تحديد الجرعة القاتلة للنصف لمركب الجارودنا بالتقييم الحيوي على الفئران كانت الجرعة القصوى ٢٥مللج/كج وكـــانت الجرعــة الدنيـا ٢,٥ مللج/كج وكانت عدد الفئران بكل مجموعة ١٠ وعدد المعاملات ١١ ونســبة الموت بعـــد ٢٤ ســاعة مــن الحقــن وفــي الغشــاء الــبريتونى هــى :
٠،٠،٢،٣،٦،٩،١٠،١٠،١٠،١٠،١٠

الجرعـــــة مللج/كج	لو الجرعة	عددالكائنات /مجموعة (n)	نسبة الموت	(n-r)	r.(n-r)
٢,٥٠	٠,٣٩٨	١٠	٠	١٠	٠
٣,١٦	٠,٤٩٨	١٠	٠	١٠	٠
٣,٩٨	٠,٥٩٨	١٠	٢	٨	١٦
٥,١٠	٠,٦٩٨	١٠	٣	٧	٢١
٦,٣١	٠,٧٩٨	١٠	٦	٤	٢٤
٧,٦٤	٠,٨٩٨	١٠	٩	١	٩
١٠,٠	٠,٩٩٨	١٠	١٠	٠	٠
١٢,٥٩	١,٠٩٨	١٠	١٠	٠	٠
١٥,٨٥	١,١٩٨	١٠	١٠	٠	٠
١٩,٩٥	١,٢٩٨	١٠	١٠	٠	٠
٢٥,٠٠	١,٣٩٨	١٠	١٠	٠	٠
		١١٠	٣٠		٧٠

الحد الأخير = الأول + (عدد الحدود-١)d

١,٣٩٨ = ٠,٣٩٨ + (١١-١). d   ∴ ١٠d = ١,٣٩٨-٠,٣٩٨=١   d= ٠,١

الجرعة القاتلة للنصف (M) =

x_x(الجرعة القاتلة ١٠٠%) +½لو d (ثابت الفترات)-مجـ r(مج الموت الكلى)/ n .d

= ٠,٩٩٨+ ٠,١ /٢- ٣٠×٠,١/ ٧٠ = ٩,٧٥

التباين اللوغاريتمى $V_m = d^2/ n^2(n-1)$. مجـ r (n-r)= [(٠,١)٢ / (١١-١)١٢١] ٧٠= ٥,٧٨٥١×١٠⁻٦

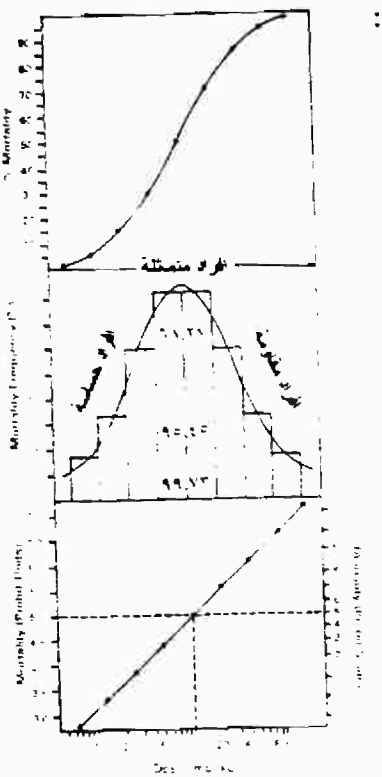
الخطأ القياسي SE_m = ٠,٠٢٤٠٥

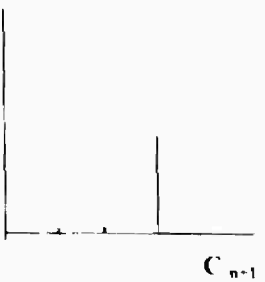
SE_m ± M = ٠,٠٢٤٠٥ ± ٠,٩٧٥

عرض نتائج التقييم الحيوي

عند عرض النتائج الخاصة بمجموع أفراده متماثلة في صورة علاقة بين درجة الاستجابة (%للموت) وتركيزات منخفضة فإنها لا تعطى نسب مـــوت مقابلة لها ولكن عند تعرضها لأول تركيز مرتفع(C_{n-1}) يقتل جميـــع الأفـــراد وبتمثيلها بيانيا نحصل على خط رأسي على بعد معين من المحور السيني .

وعند عرض النتائج لأفراد مجموع غير متماثل كما بالطبيعة في صـــورة علاقة بين درجة الاستجابة (الفرق في النسبة المئوية للموت بين كل تركيزين متتالين نحصل على منحنى تكراري معتدل (Normal Frequency curve) شكل رقم (٣- ٦) والذي يلاحظ فيه ما يلي:





C_{n-1}

منحني الجرعة-الإستجابة

شكل رقم (٣-٦):منحنى تكراري معتدل يربط التكرارت-الفرق%للموت

١. للمنحنى نهاية عظمى بالمنتصف ثم تقارب على جانبي هـــذه النهايـــة متساوي ومتماثل لتماثل غالبية الأفراد في درجة استجابتها .

٢. نجد أن ٦٨,٢٧ % من عدد الافراد تنحصر استجابتها بين التركـيزين C_2-C_3 أي وحدة إنحراف معياري واحدة أي $M \pm 1\,SD$

٣. بزيادة عدد التركيزات يصبح المنحنى أكثر تفرطحا لانخفاض نســـبة الموت بين كل تركيزبين متتالين فنجد أن :

٩٥,٤٥% من عدد الأفراد تنحصر بين القيمتين $M \pm 2\,SD$

٩٩,٧٣% من عدد الأفراد تنحصر بين القيمتين $M \pm 3\,SD$

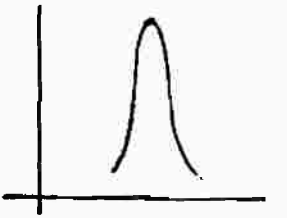
أي أن كل وحدة إنحراف معياري تمثل نسبة أفراد تزداد حول الوسط وتقل بالاتجاهين فيتحول لخط مستقيم ويأخذ الأشكال التالية ، شكل رقم (٣-٧)

منحنى تكراري مفلطح

Platy curties F. curue

• منحنى متماثل اكثر تفرطحا

• يحتوى على نسبة كبيرة من الأفراد متجانسة الاستجابة في مدى واسع من التركيزات

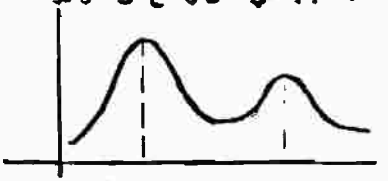


منحنى تكراري مدبب

Leptocurties F. curve

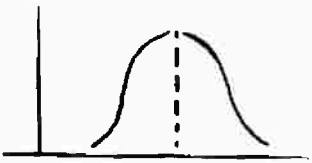
•منحنى تكراري متماثل أكثر تدبب

•يحتوى على نسبة قليلة من الأفراد المتجانسة في مدى ضيق من التركيزات



منحنى تكراري ذو قمتين

منحنى تكراري له قمتين لاحتواء السلالة على مجموعتين مختلفتين من حيث درجة استجابتها للتركيزات



منحنى تكراري سالب(-) أو موجب(+)

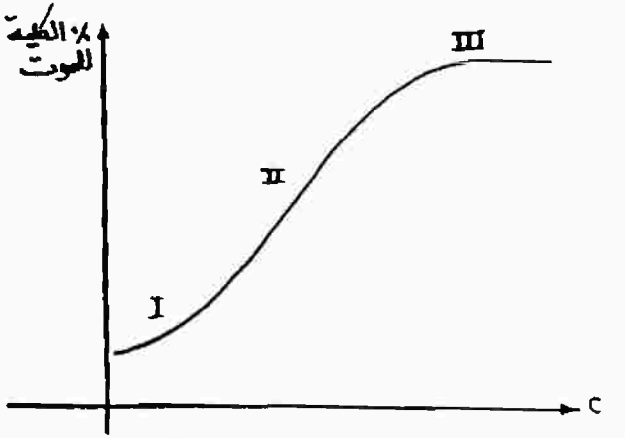
Skwnesis F. curul

منحنى تكراري ذيله لليسار

يحتوى على نسبة كبيرة من الأفراد متجانسة الاستجابة بالجانب الأيسر (تركيزات منخفضة)

شكل رقم (٣-٧) : أشكال المنحني التكراري السابق

أما عند عرض النتائج السابقة ولكن في صورة علاقة بين النسبة الكلية للموت و التركيزات (وذلك بحساب % للموت بين كل تركيزين متتاليين ثم تجمع على نسبة الموت الأصلية) فنحصل على منحنى تكراري متجمع أو تراكمي (Comulative Ferquensy curve) يمر بثلاث مراحل بالشكل رقم(٣-٨):



شكل رقم (٣-٨) :منحني تكراري تراكمي للعلاقة بين الجرعة- الإستجابة

المرحلة الأولى: جهة اليسار وتمثل الأفراد الحساسة و التي لا تحتاج لزيادة في التركيز لتظهر استجابتها .

المرحلة الثانية: تتوسط المنحنى وتمثل الأفراد و الأكثر تحملا وتمثل معظم الأفراد المتماثلة نتيجة الثبات النسبي في درجة استجابتها حتى مع التغير في التركيز القاتل حيث أن الزيادة في التركيز يقابلها زيادة في نسبة الموت .

المرحلة الثالثة:جهة اليمين ويمثل الأفراد المقاومة و التي تحتاج لزيادة أكبر في التركيز حتى تظهر درجة استجابتها .

ويصعب من المنحنى السابق تحديد :

أ-الجرعة القاتلة أو الجرعة ٣٥% أو ٩٥% بدقة خاصة عند دراسة ظاهرة تطور المقاومة بالكائنات سريعة التكاثر

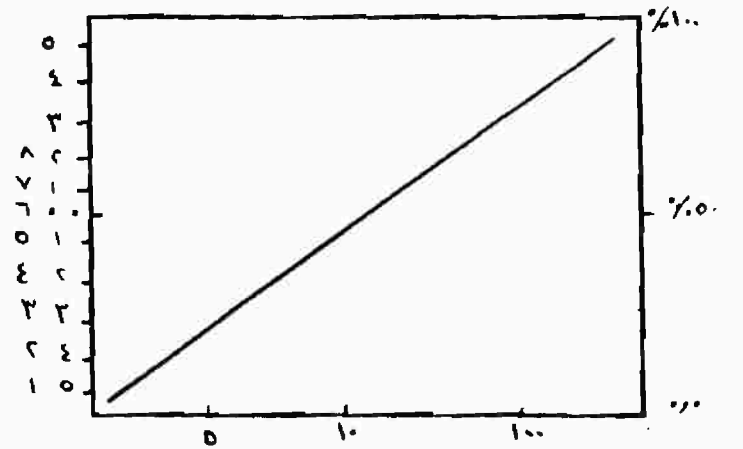
ب- ميل المنحنى وذلك لعدم خطيته

جـ- % للموت لتركيزات لم تستعمل بالتجربة خارج نطاق التركيزات المستخدمة كذلك % صفر للموت أو ١٠٠%

د- مقارنة منحنى سلالة بمنحنى سلالة أخرى لنفس التركيزات أو العكس

لذا قام Gaddum بتحويل هذا المنحنى السيجمويدى الغير متماثل لخط مستقيم حيث تتناسب درجة الاستجابة (%للموت) طرديا مع لوغاريتم التركيز وليس تبعا للتركيز كما بقانون Weber fechner فينتج منحنى أكثر تماثلا لتضاعف قيم التركيزات (لو ١٠=١ ، ١٠٠=٢)

ثم قام العالم Bliss بتعديل قيم وحدات الإنحراف المعياري وحولها لوحدات بروبيت (Probability unites : Probits) بإضافة رقم ثابت (٥) لوحدات الإنحراف المعياري ورسم العلاقة على ورق لو-بروبيت ووقع الاستجابة على مقياس البروبيت للتركيزات بصورة لوغاريتمية فأعطت خط إنحدار مستقيم وسمى بمنحنى لوغاريتم الجرعة -الاحتمال-Ldp: Log dosage probit line) (line ، شكل رقم (٣-٩) وقام بعمل الجدول رقم(٣-٢) :



شكل رقم (٣-٩) :منحني لو الجرعة- الإحتمال

جدول رقم (٣-٢) :تحويل النسب المئوية للإبادة إلي وحدات بروبيت(قيم احتمال مقابلة)

% kill	٠	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩
٠٠	–	٢,٦٧	٢,٩٥	٣,١٢	٣,٢٥	٣,٣٦	٣,٤٥	٣,٥٢	٣,٥٩	٣,٦٦
١٠	٣,٧٢	٣,٧٧	٣,٨٢	٣,٨٧	٣,٩٢	٣,٩٦	٤,٠١	٤,٠٥	٤,٠٨	٤,١٢
٢٠	٤,١٦	٤,١٩	٤,٢٣	٤,٢٦	٤,٢٩	٤,٣٣	٤,٣٦	٤,٣٩	٤,٤٢	٤,٤٥
٣٠	٤,٤٨	٤,٥٠	٤,٥٣	٤,٥٦	٤,٥٩	٤,٦١	٤,٦٤	٤,٦٧	٤,٦٩	٤,٧٢
٤٠	٤,٧٥	٤,٧٧	٤,٨٠	٤,٨٢	٤,٨٥	٤,٨٧	٤,٩٠	٤,٩٢	٤,٩٥	٤,٩٧
٥٠	٥,٠٠	٥,٠٣	٥,٠٥	٥,٠٨	٥,١٠	٥,١٣	٥,١٥	٥,١٨	٥,٢٠	٥,٢٣
٦٠	٥,٢٥	٥,٢٨	٥,٣١	٥,٣٣	٥,٣٦	٥,٣٩	٥,٤١	٥,٤٤	٥,٤٧	٥,٥٠
٧٠	٥,٥٢	٥,٥٥	٥,٥٨	٥,٦١	٥,٦٤	٥,٦٧	٥,٧١	٥,٧٤	٥,٧٧	٥,٨١
٨٠	٥,٨٤	٥,٨٨	٥,٩٢	٥,٩٥	٥,٩٩	٦,٠٤	٦,٠٨	٦,١٣	٦,١٨	٦,٢٣
٩٠	٦,٢٨	٦,٣٤	٦,٤١	٦,٤٨	٦,٥٥	٦,٦٤	٦,٧٥	٦,٨٨	٧,٠٥	٧,٣٣

و لكي يكون الخط مستقيم لابد وأن يكون :

أ-حساسية الأفراد بالعينة موزعة طبيعيا أي تمثل بمنحنى تكراري معتدل

ب-نسبة المركب السام الداخلة للجسم إلى الكمية الكلية المتعرض لها ثابتة حيث الجرعة الداخلة للجسم = ثابت × كمية المركب المتعرض له

وقيمة هذا الثابت غير معلومة وتتغير طريقة التعريض حيث تكون اكبر في حالة المعاملة السطحية عن حالة التعرض للمتبقيات . فكلما زادت كمية المترسبات زادت الكمية المتلقطة حتى حد معين يخشى بعدة من زيادة التركيز فتزداد سمك طبقة المترسبات دون زيادة الكمية الملتقطة فتقل قيمة الثابت بالتركيزات المرتفعة .

توقيع (رسم : Fitting) الخط :

أ-توقيع الخط بالعين المجردة (Fitting of straight line by eyes):

وهنا يعتمد توقيع الخط أو توصيل الخط فيما بين هذه النقط على الخبرة بالنظر (best fit) ليمر بغالبيتها خاصة النقاط الواقعة في المدى بين ٢٠-٨٠% و الذي يمثل غالبية الأفراد المعاملة ذات الوزن (Weight) وعند تعذر

رسمة أو لقلة الخبرة أو لقلة عدد التركيزات المختبرة أو لبعدها كثيرا علي أن يمر خط يتوسطها يلجأ إلى طريقة المربعات الصغرى .

ب- طريقة المربعات الصغرى : Least squares method

وتعتمد هذه الطريقة على ايجاد قيمة انحراف كل نقطة عن خط الانحدار من خلال تقدير قيم χ ، Y من معادلة الخط المستقيم حيث يكون الخط الذي يطابق النقط مطابقة كاملة هو الخط الذي يكون فيه مجموع مربعات انحراف النقط أقل ما يمكن فنسبة الموت γ تعتمد على التركيز χ حيث f دالة التركيز (χ) أي أن γ = f(χ)

فعند اجراء التقييم الحيوى لمستخلص البتروليم إيثير لحبوب نبات الحلبة على حشرة *Sitophylus Oryzae* مضاف إلى بيئتها الغذائية وبتركيزات ٢٠, ٤٠, ٠, ٨٠, ٠, ١,٦٠, ٣,٢٠ كانت نسبة الاستجابة المقابلة لها ١٠ و١٣ و ٢١ و ٥٦و ٨١ % ويراد توقيع الخط بطريقة المربعات الصغرى و إيجاد قيمتي الجرعة القاتلة للنصف والميل .

الجرعة χ	لو الجرعة	%للموت المصحح	%للموت الجدوليه	٢χ	χ . y	Eχ . Ey
.٢٠	٠,٣٠١	١٠	٣,٧٢	٠,٠٩٠٦	١,١١٩٧	
.٤٠	٠,٦٠٢	٣١	٣,٨٧	٠.٣٦٢٤	٢,٣٢٩٧	
.٨٠	٠,٩٠٣	٢١	٤,١٩	٠,٨١٥٤	٣,٧٨٣٩	١٠٢,٩٨٧١
١,٦٠	١,٢٠٤	٥٦	٥,١٥	١,٤٤٩٦	٦,٢٠١٢	٥
٣,٢٠	١,٥٠٥	٨١	٥,٨٨	٢,٢٦٥٠	٨,٨٥٠٣	
			٢٢,٨١	٤,٩٨٣	٢٢,٢٨٤٨	٢٠,٥٩٧

الميل = مج χ . y- (Eχ . Ey /n) /E x² - (E x)²/n =٢٢,٢٨٤٨ -٢٠,٥٩٧ /٤,٩٨٣-١,٠٧٧=

١,٦٨٧٨ /٠,٩٠٦= ١,٨٦٢٩

y₁=y` +b (x₁- x`)=٤,٥٦٢+١,٨٦٢٩(٠,٣٠١-٠,٩٠٣)= ٣,٤٤ تقابلها ٦,٠

y₂=y` +b (x₂- x`)=٤,٥٦٢+١,٨٦٢٩(٠,٦٠٢-٠,٩٠٣)=٤,٠٠ ١٦,٠

٣٣,٠ ٤,٥٦ =(٠,٩٠٣-٠,٩٠٣)١,٨٦٢٩+٤,٥٦٢=$(x` - x_3)$ b+ y`=$y_3$

٥٥,٠ ٥,١٢ =(٠,٩٠٣-١,٢٠٤)١,٨٦٢٩+٤,٥٦٢=$(x` - x_4)$ b+ y`=$y_4$

٥٧,٠ ٥,٦٨ =(٠,٩٠٣-١,٥٠٥)١,٨٦٢٩+٤,٥٦٢=$(x` - x_5)$ b+ y`=$y_5$

وبتوقيع قيم y الجدولية الجديدة في مقابل لو الجرعة يسهل رسم خـــط مستقيم منه يستنتج

٧,٠٠ =LC_{90} ١,٤٠ =LC_{90} ٠,٧١ =LC_{30}

- ن/(x)٢ مج -(x2)مج - (x-x)٢ مج X^2

ج-طريقة المربعات الصغرى للنقط المرجحـــة (Least squares of weighted point)

ويلاحظ بالطريقة السابقة أن النسبة المئوية للموت بالقرب من النســبة ٥٠% متقاربة ومتكدسة و الخطأ في هذه المنطقة لن يغير وضع الخط بينمـا نجد العكس مع النسبة المئوية للموت المنخفضة الأقل من ٥٠% أو الأكثر من ٥٠% حيث يتباعد القيم عن بعضها و أي خطأ بسيط يؤثر على وضع الخـط وهنا فمعاملة جميع النقط بالتساوي يؤدى لأخطاء في توقيع الخط لذا لابد مـن ترجيح أو وزن هذه النقط (Weighted points) من العلاقة :

وزن (ترجيح) النقطة =

عدد الأفراد المختبرة n S^2(إحداثي المنحنى الطبيعي عند درجة الاستجابة المتوقعة) /

النسبة المتوقعة للأفراد المستجيبة (١- s)

وعليه فعند تطبيق نفس الخطوات السابقة حتى توقيع الخط على الورق اللوغاريتمي ومنه تقرأ قيم البروبيت المتوقعة y للقيم X ثم :

أ-تحسب قيمة البروبيت المعامل (Working probit) من المعادلة Kp + yo = y

حيث p نسبة الموت المصححة ، k ، yo فمن الجدول المقابلة للقيمة y

ب-إيجاد معامل الترجيح (Weighting coeff : k) لكـل نقطـة مـن الجـدول وبضرب عدد الكائنات × التركيز ينتج الترجيح (w)

جـ- يحسب لكل خط قيمة × x. y , w o وتسجل بالجدول ثم تجمع قيم (Ew)w , (Exw)wx , (Ewy)wy ثم توجد المتوسطات Y= (Ew ÷ Exy) و كذلك X`=(Ew ÷Exy)

د-لكل خط تضرب قيمة x.wx وتجمع Ewx^2 وبالمثل y.wy وتحصل على قيم $Y.wx , Ewy^2$ المتحصل على Ewx.y

هـ- نحسب الميل $b = xEwy- Ewx^2 ÷ x`Ewy-Ewyx$

و-تصبح معادلة الانحدار y=Y`+b(x`-x) = (bx-y`) + bx ثم تقارن قيم y بقيم البروبيت المتوقعة y فلا تختلف عنها

ز-ولتقدير مدى دقة قيمة LD_{50} يحسب :

الاختلاف عن المتوسط (Variance : V) = ١/EW + $(m-x`)^2$/ EWX2 - (EWX)2/`

تقدير قيمة X^2 للبيان مدي تجانس النتائج = (y`Eyx Ewy ) -b ( x`Ewy – Ewxy)

حيث تقارن هذه القيمة بالقيمة الجدولية تحت درجات حرية (n-2) حيث n هي عدد التركيزات فإذا :

زادت عن مستوي احتمال ٥% تعتبر الإختلافات مؤكدة و يعاد الحسابات

قلت عن مستوي احتمال ٥% تعتبر الإختلافات غير معنوية

ح-تحسب قيم حدود الثقة علي مستوي ٩٥ %

m1 = m -١٫٩٦ $V^{1/2}$

m2 = m +١٫٩٦ $V^{1/2}$

مثال :

التركيز X	لو X	% الموت	عدد n	p	Y	y	k	w	wx	wy	wxy
٠.٠	—	٨	٥٠								
٠.٥	٦٩٩	٢٢	٥٨	٤.٠٥	٣,٨	٤.٠٩	٣٧٠	٢١,٥	١٥,٠٢٨	٨٧,٩٣	٦١,٤٧
٠٧٥	٨٧,٥	٣٠	٤٦	٤,٢٩	٤,٦	٤,٣١	٦٠١	٢٧,٦	٢٤,١٥	١١٨,٩	١٠٤.٠
٦,٠	١,٠٠	٥٧	٨٣	٥,٠٨	٥,١	٥,٠٨	٦٣٤	٥٢,٦	٥٢.٦	٢٦٧.٢	٢٦٧.٢
٢.٠	١,٣٠١	٩٢	٥٠	٦,٢٤	٦.٣	٦.٣٤	٣٣٦	٦,٨	٢١,٨٥٧	١٠٦,٥	٥٦,٠٨
٣,٠	١.٤٧٧	١٠٠	٤٠	٨,٠٩	٧,٠	٧,٤٢	٠,١٣١	٥,٢	٧,٦٨	٣٨,٥٨	٥٦.٩٨
	٤,٩٠٣					٢٥,٣			١٢٢,٧	١٢١,٣	

الميل = $x`Ewy - Ewx^2 / x`Ewy - Ewxy$ = ٤,١٨١

y =(bx`-y`) + bx = y` + b (x`-x) =٤,١٨١ +٠,٩١

التباين عن المتوسط (V) =1/b { 1/sw +[x`-m^2]/Σwx^2-$(\Sigma wx)^2$ /Σw]}

=١/٤,١٨١[١/١٢٣,٧+(.٩٧٨٥-.٩٨٠٧)٢/١٥.٠١٢٤-١٢١,٣١٥)/١٢٣,٧٢

=٠,٠٠٤٦٢

مدي تجانس التباين =Σwy^{2} _ Σxy (x`y)_ b(xΣwyx _ Σwy)

=٣١٦١٣٥-٥,٠٠٦x ٦١٩,١٩٥ =٣,٥٢٨

حدود الثقة m_1 = m -١.٩٦ $V^{-1/2}$ = m -١.٩٦(٠.٠٠٠٤٦٢)$^{-١/٢}$

= m -١.٩٦ X ٠,٠٢١٥

m_2 = m +١.٩٦ $V^{-1/2}$ = m +١.٩٦(٠.٠٠٠٤٦٢)$^{-١/٢}$

=m +١.٩٦ X ٠,٠٢١٥

خصائص خط لوغاريتم الجرعة-الاحتمال (Ldp line : log-dosage probit line)

يفيد في تقدير قيمتي الجرعة القاتلة للنصف أو التركيز القاتل للنصف (LC_{50},LD_{50}) بهدف تقدير حساسية أو مقاومة سلالة كائن حي ما لتحديد موقفها والتنبؤ بالتالي بظهور المقاومة .

كما يفيد في مقارنة سمية مجموعة من المركبات المختبرة على كائن معين (Screening) أو مقارنتها ببعضها من خلال :

- الكفاءة النسبية (Relative potential) =

قيمة الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) لأقل مركب ÷ قيمة الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) لأي مركب آخر .

- دليل السمية (Toxicity Index) =

قيمة الجرعة القاتلة للنصف لأكفأ مركب ÷ قيمة الجرعة القاتلة للنصف لأي مركب آخر ×١٠٠

وهنا يعطى لأفضل مركب له قيمة جرعة قاتلة للنصف (LD_{50}) صغيرة درجة ١٠٠ و الباقي الأقل أقل من ١٠٠ فترتب المركبات تبعا لكفاءتها الإبادية تنازليا .

- عامل السمية المشتركة (Co-toxicity factor) =

الجرعة الفعلية المركب أ بالمخلوط + الجرعة الفعلية من ب في المخلوط
الجرعة المقاسة من المركب أ الجرعة المقاسة من المركب ب بالمخلوط

فإذا كانت القيمة الناتجة تساوي ٢٥% يكون الفعل تضاد
فإذا كانت القيمة الناتجة أكبر من ٢٥% يكون الفعل تقوية } سالم ١٩٩٠
فإذا كانت القيمة الناتجة تساوي ٢٥+٢٥ يكون الفعل إضافة

معامل السمية المشتركة (Co-toxicity Coefficient) =

$$\frac{\text{السمية الفعلية للمركب (أ) بالمخلوط}}{\text{السمية النظرية للمركب (أ) بالمخلوط}} \times ١٠٠$$

$$= \frac{\text{\%للموت المتوقع} - \text{\%للموت الملاحظ}}{\text{\% للموت المتوقع}} = \chi$$

فإذا كانت القيمة الناتجة تساوي ٢٠% يكون الفعل تضاد
فإذا كانت القيمة الناتجة أكبر من ٢٠% يكون الفعل تقوية
فإذا كانت القيمة الناتجة تساوي ٢٠+٢٠ يكون الفعل إضافة

٣ . كما يفيد في تقدير قيمة الميل (Slope) المعبرة عن درجة تماثل الأفراد المختبرة من حيث درجة تحملها للمركب وتحسب قيمته بقسمة LD_{90}/ LD_{50} .

ويزداد ميل الخط (الانحدار) بزيادة تماثل السلالة في درجة استجابتها وهنا تكون قيمة القسمة أقل ومنخفضة والعكس صحيح . فأرتفاع ميل الخط يدل على زيادة ميل السلالة نحو الحساسية للمركب والطريقة المتبعة في التعريض أو لكليهما عند تماثل الأفراد المعرضة .

٤ . اذا توازي خطي سمية لمركبان فهو ما يشير لأن طريقة فعلهما واحدة (Mode of action)

٥ . ويلاحظ من المنحنى :

- تغير درجة الاستجابة بتغير التركيز مع تثبيت فترة التعريض (ميعاد الفحص)
- تغير درجة الاستجابة بتغير الزمن مع تثبيت التركيز وهنا تحصل على منحنى الزمن والاستجابة (Time- Response curve) وهو منحني سيجمويدي و يحول إلي خط مستقيم بإستخدام لوغاريتم الزمن و منه يقدر قيمة الزمن

القاتل للنصف (Lethal time 50 : LT_{50})

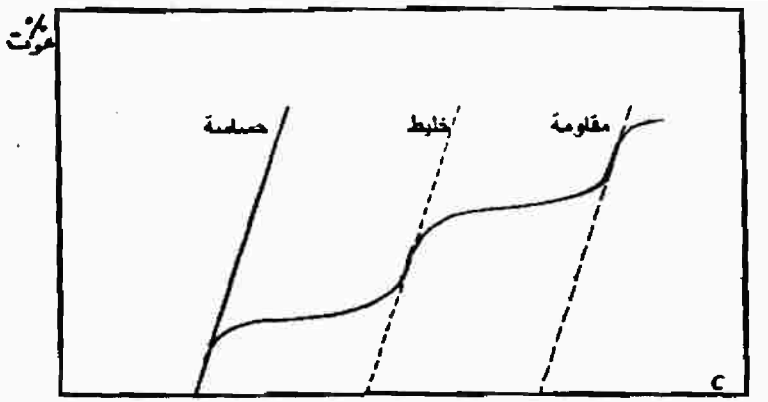
- تزداد قيمة الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) في حالة انعكاس المقاومة (Resistant reversion) وهنا يتحرك الخط لليسار و تتدريجيا :

فإذا كانت درجة مقاومة الجيل الأول F1 = LD_{50} لها ÷ D_{50} للحساسة = ١ السلالة حساسة
فإذا كانت درجة مقاومة الجيل الثاني F2 = LD_{50} لها ÷ LD_{50} للحساسة = ٢ ذات تحمل ضعيف
فإذا كانت درجة مقاومة الجيل الثالث F3 = LD_{50} لها ÷ LD_{50} للحساسة = ٢,٩ ذات تحمل فائق
فإذا كانت درجة مقاومة الجيل الرابع F4 = LD_{50} لها ÷ LD_{50} للحساسة = ٦,٥ ذات تحمل فائق جدا
فإذا كانت درجة مقاومة الجيل الخامس F5 = LD_{50} لها ÷ LD_{50} للحساسة = ١٠ سلالة مقاومة

- كذلك يشير قلة الميل التدريجية للخط بكل جيل على تكوين سلالة مقاومة فالميل يدل على مدى تجانس وتماثل السلالة كما سبق لحدوث توزيع انتخابي للجين المقاوم بسرعة فعند معاملة سلالة حساسة تقتل نصفها ويتبقى النصف الأكثر تحملا و الذي إذا ما عرض مرة أخرى لنفس الجرعة ترتفع درجة تحملها وتتقص الأفراد الحساسة تدريجيا .

٦ ٠في حالة كون أفراد السلالة خليط فإن صفة المقاومة تكون سائدة (Dominant) حيث يوجد جين المقاومة بالأفراد المختلطة في تركيبها الوراثي . وتماثل الأفراد المقاومة في درجة تحملها أو تكون صفة المقاومة على جين متنحى (مقاومة متنحية) وتمثل الأفراد الحساسة وهنا يكون الخط غير مستقيم وينثني عند نسبة الموت المقابلة للأفراد الحساسة شكل رقم (٣-١٠) ويكون هضبة حيث لا تؤدى الزيادة في التركيز لزيادة مقابلة في نسبة الموت ثم ينثني مرة أخرى حال وجود أفراد ذات تحمل (مقاومة) وكلما زاد الفرق بين تحمل الأفراد الحساسة والهجين كبرت الهضبة .

٧ ٠عند تعريض سلالة لمركب سام مضاف إليه عامل منشط (Synergistic factor) غير سام قاتل يزيد السمية للمركب ربما لزيادة معدل التخلل أو معدل التثبيط لنظام إنزيمي هادم لجزيئات المركب أو لزيادة الكمية الملتقطة من المركب ، شكل رقم (٣-١١) .



شكل رقم (٣-١٠) : سيادة غير تامة (Partial dominance) لوجود أفراد خليط

وتكون النسبة المئوية لدرجة التنشيط (Synergistic rate) = معامل السمية المشتركة =

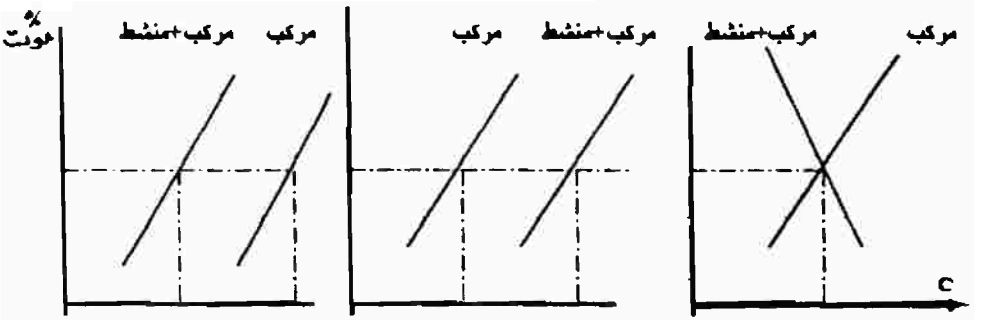
الجرعة القاتلة للنصف للمركب (LD_{50}) / الجرعة القاتلة للنصف للمركب (LD_{50}) + المنشط

فإذا كانت قيمة = ١ إضافة
فإذا كانت قيمة =< ١ تنشيط
فإذا كانت قيمة => ١ تضاد

و هنا تقيم المواد المنشطة بمعياران هامان وهما :

- قيمة الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) وتفيد في تحديد فعل المنشط
- ميل الخط وتفيد في تحديد طريقة فعل المنشط :

فإذا كان ميل الخط أكبر من ميل خط المركب فقط : تنشيط
فإذا كان ميل الخط أقل من ميل خط المركب فقط : تضاد



•تتساوي الجرعة القاتلة للنصف للمركب والمنشط	•للمنشط تأثير تضادي فارتفعت قيمة الجرعة القاتلة للنصف للمركب +المنشط	•إنخفضت قيمة الجرعة القاتلة للنصف للمركب + المنشط لزيادة معدل النفاذية أو تحلل المركب أو لتثبيط الهادم للمركب .
•ميل الخطين مختلف لإختلاف طريقة الفعل .	•ميل الخطين واحد (متوازيان) لتماثل طريقة الفعل .	•ميل الخطين واحد لتماثل طريقة الفعل .

شكل رقم (٣-١١) : التأثيرات المختلفة لإضافة المنشط للمركب السام المختبر

العوامل المؤثرة على الجرعة القاتلة للنصف وميل خط لو الجرعة-استجابة

١-عوامل داخلية متعلقة بالكائن المختبر (Intrinsic Factors) :

١-١-نوع الكائن المختبر :

حيث تختلف سمية المركب المختبر باختلاف نوع الكائن المعرض له فهناك بعض الأنواع تتحمل فعل السموم أكثر من غيرها ويرجع مدى الاختلاف في حساسية الأنواع لإختلاف التركيب التشريحي للكائن المختبر (سمك الجلد فتقل النفاذية والتخلل) أو لإختلاف فسيولوجي يقلل من المقدرة

على التقاط جزيئات السم و الاختلاف الوراثي كتكرار جين كذلك عدد الجينات المقاومة ودرجة سيادتها والانتخاب السابق للمركب على نفس النوع ودرجة موائمة الجين كلها عوامل تؤثر بدورها على قيمة الجرعة القاتلة للنصف والميل .

١-٢-الاتسلاخ و الطور والعمر (Instar , stage & age): حيث تختلف درجة تحمل الاتسلاخات المختلفة بالطور الواحد فيرقات الاتسلاخ الأول تختلف في درجة تحملها عن الثاني والثالث ولكن عند أخذ الجرعة (التركيز) بالنسبة للوزن لتساوت . وغالبا ما يزداد درجة التحمل بتقدم العمر وتزداد الحساسية عقب الاتسلاخ مباشرة قبل تكوين الأنسجة الدعامية التى تزيد من تصلب الكيوتيكل (الجليد) لترسب البروتين المندمج مع نواتج أكسدة مشتقات الفينولات .

كذلك فالأطوار الخاملة كالبيض والعذارى فهي أكثر تحملا عن الأطوار النشطة كاليرقات والطور الكامل حيث تختلف مدى تحمل الطور الكامل يتقدم العمر وهو ما يرجع للاختلافات الفسيولوجية والتشريحية وما يرتبط بها من تفاوت في الحجم والتركيب والمكونات الحيوية الداخلية لكل طور والنشاط الإنزيمي (أي التغيرات الفسيولوجية و البيوكيميائية المختلفة)

ولكن عند حساب الجرعة (التركيز) على أساس الوزن نجد أن التطور في الأطوار أو تقدم العمر نجد الاستجابة ثانية تقريبا .

وعموما تقل الحساسية بتقدم العمر والتطور وغالبا ما يرجع ذلك لزيادة الوزن ولكن كنتيجة توكسيكولوجية ليست صحيحة لتعديل قيمة الجرعة (التركيز) تبعا للوزن و يجب الأخذ في الإعتبار أن الإستجابة بجانب إرتباطها بوزن الكائن قد ترتبط أيضا بمساحة المسطح الداخلي أو الخارجي المعرض لذا نجد أن :

LD_{50} (LC_{50}) × مساحة الجسم ÷ وزن الجسم =

= ثابت × وزن الجسم $^{٢/٣}$

١-٣-الجنس (Sex) : يفضل استخدام الجنسان معا في التجارب لكل معاملة خاصة عند عمل خط لو الجرعة - الاستجابة .

فالذكور أكثر حساسية من الإناث لصغر حجمها علاوة على انخفاض نسبة الأجسام الدهنية بأجسامها عن الإناث كذلك الفروق البيولوجية بينهما لها أثر على الاستجابة .

١-٤-بيولوجية الكائن المختبر : فإختلاف دورة حياة الكائن وطريقة تكاثره وهجرته وحركته وطريقة تغذيته وكميتها ونوعها والانسلاخ عوامل تؤدى منفردة أو مجتمعة لتفاوت درجة حساسية الكائن المختبر .

٢-عوامل متعلقة بالمركب السام المختبر :

٢-١-نوع المركب السام المختبر: حيث تختلف سمية كل مركب بالنسبة للنوع الواحد بل بالنسبة للطور والعمر في نفس النوع كما سبق توضيحه .

فكلما زادت سمية المركب انخفضت قيمة الجرعة القاتلة للنصف (LD50) وزاد الميل كما يزداد الميل أيضا بتماثل أفراد المجموع . واختلاف الميل في خطين سمية يعنى اختلاف المركبين المستخدمين في طريقة فعلهما

٢-٢-طريقة المعاملة : حيث تقل الجرعة (أو التركيز) القاتل للنصف ويزداد ميل الخط انحدارا بأتباع طرق المعاملة (التعريض) الشديدة التأثير كالحقن و العكس بالمعاملة الفمية (السطحية) حتى أن الاستجابة الظاهرة عقب الحقن مباشرة تكون أكثر تماثلا وشدة الميل أكثر انحدارا

٢-٣-نوع المذيب :قد تؤدى استخدام المذيب كأداة (Vechiel) للمساعدة في أجراء المعاملة (التعريض) لزيادة كمية ما يلتقط وما ينفذ خلال الطبقات (حواجز) الجسم من المركب المختبر (كما لو أن الجرعة مرتفعة) وهنا يمكن خفض قيمة الجرعة (التركيز) المستخدم .

فاستخدام مذيب الأسيتون مثلا يرفع سمية التركيزات المنخفضة المعاملة قميا بينما يخفض من تأثير الجرعات المرتفعة لترسبها فلا تمتص إلا نسبة قليلة منها مما يؤدى في النهاية إلى رفع الجرعة القاتلة للنصف وينخفض بالتالي الميل .

واستخدام المذيبات و التي تغير من طبيعة طبقة الليبيد عن وضعها الموازايكي مثل مذيب داى ميثيل سلفوكسيد (DMSO) فتوقف المقدرة الاختيارية لنفاذ جزيئات المركب فتزداد النفاذية خلال طبقة الأدمة (الجلد) حيث تزيل بعض الأجزاء الليبيدية فتعمل ثقوب بطبقة القرنية وتحل جزيئات المذيب محل جزيئات ماء الجلد فتغير وبنمط عكسي من تركيب بروتين القرنية .

٢-٤-فترة التعريض: إطالة فترة التعريض لتركيز ما يؤدى لزيادة السمية فتنخفض الجرعة (التركيز) القاتل للنصف ويزداد الميل وقد لا تظهر أعراض السمية المنتظرة على فترة التعريض القصيرة فقيمة التركيز القاتل للنصف (LC_{50}) للدروسفولا ٢٠٠٠ مثل عند استمرار التعريض لمدة ٢٤ ساعة / ددت وتنخفض إلى ٦ أمثال عند التعريض لمدة ٦ ساعات ، كما أن إطالتها فروق في مدى تحمل الأفراد المعاملة .

أما فترة ما بعد التعريض فتزداد نسبة الموت بزيادتها أو هي الفترة التي لا يجب وأن يزيد خلالها نسبة الموت فالأفراد المنتظر موتها بهذا التركيز يجب وأن تكون قتلت بالفعل لذا فنسبة الموت بعد ساعة أقل من مثيلتها بعد ٦ ساعات أو ١٢ أو ٢٤ ساعة تبعا لنوع الكائن والمركب المختبر .

٣-عوامل متعلقة بالبيئة الخارجية (Extrinsic factors):

٣-١-درجة الحرارة : تؤثر درجة الحرارة المربى عليها الكائن المختبر قبل اختباره أو أثناء التعريض أو ما بعد التعريض على درجة تحمل الكائنات للمركب المختبر و بالتالي على قيمة الجرعة القاتلة للنصف والميل وهو ما يرجع إلى :

٣-١-١-تأثيرها على العمليات الفسيولوجية من حيث تحملها للمركب المختبر فإذا كانت درجة الحرارة مناسبة (Optimum temperature) كلما استطاع الكائن تحمل تركيز أعلى دون أن يموت .

٣-١-٢-تأثيرها على نشاط الكائن المعرض وحركتها مما يؤثر بدوره على الكمية الملتقطة من المركب المختبر .

٣-١-٣-تأثيرها على النظم الإنزيمية و التي قد تتدخل في هدم هذه المركبات مثل إنزيم ددت-ديهيدروكلورونيز و الإنزيمات ذات الوظيفة المختلطة (Mixed Function Oxidase : MFO) فالإنزيم الأول له معامل حراري سالب (Negative temperature coefficient) فيكون أقل نشاطا على درجات الحرارة المنخفضة و بالتالي يكون مركب ددت أكثر سمية على درجات الحرارة المنخفضة للكائنات المعاملة بها والعكس في حالة ارتفاع درجة الحرارة قد تؤدى لتنشيط الإنزيم الهادم لجزيئات المركب وقد يكون العكس مع الديلدرين و الالدرين فتكون أكثر سمية على درجة الحرارة المرتفعة فهي ذات معامل حراري موجب (Positive Temperature Coefficient : PTC) وهو ما يحدث عند تعرض الذباب المنزلي وبعوض الإيدس لجزيئات مركب الديازينون الفوسفوري العضوي .

٣-١-٤-تربية الكائنات المعرضة كالحشرات مثل الدروسفولا وخنفساء السورينام على درجة حرارة مرتفعة تكون أكثر حساسية للتأثير اللامس لمتبقيات مركب الددت.

٣-١-٥-تؤدى تربية الكائنات قبل التعرض على درجة حرارة مرتفعة إلى نقص وزن الجسم وهو ما يؤثر بدوره على حساسيتها للجرعة (التركيز) حيث تؤثر درجة الحرارة على نوع وتركيب الدهن المتكون على درجات حرارة عالية ومتوسطة مما يؤدى لزيادة المحتوى الدهني الغير مشبع و يستدل على ذلك من خلال تقدير الرقم اليودي و الذي يبلغ ٧٢ بالصرصار الأمريكي وينخفض إلى ٦٠ بتربيته على درجات حرارة أعلى من ٣٢°م ويعزى لعدم تشبعها حيث ترتبط جزيئات المركب بها وبصورة أقوى عن الدهون المشبعة مما يعيق وصولها لمكان التأثير .

كذلك تعزى درجة التحمل (انخفاض درجة الاستجابة) للكائنات المربـاه على درجة حرارة منخفضة لانخفاض معدل النفاذية والامتصاص والانتشـار و بالتالي انخفاض سرعة أعراض التسمم فأغلب المركبات السامة أكثر سمية على درجات الحـرارة المنخفضـة : معـامل حـراري سـالب Negative) temperature coefficient : NTC) .

كذلك فلدرجة الحرارة تأثيرها بعد المعاملة حيث تؤثر على مـدى الأثـر المتبقي للمركب (Residual effect) وميكانيكية إحداث التأثير السام .

٣-٢-درجة الرطوبة : تؤثر درجة الرطوبة النسبية على اختبارات السـمية ونتائج الاختبارات الحيوية للعديد من الكائنات المختبرة فيؤدى ارتفاعها إلـى ٨٠% إلي إنخفاض سمية العديد من السموم كمركـب الـددت و زرنيخـات الكالسيوم و الكلوردين للذباب المنزلي عما في حالة كونها ٤٥% مع تثبيـت درجة الحرارة .

٣-٣-الضـوء: تؤثر طول فترة الإضاءة و نوعيتها على مـدى نشـاط بعض الكائنات مما يؤثر بدوره بطريق غير مباشر على كمية ما يلتقط مـن المركب فالذباب يلتقط ٢٥% من مركب الددت و ٦ أمثال الديلدريـن فـي الظلام عن الضوء .

كما يؤثر الضوء بطريق غير مباشر على سـرعة العمليـات الحيويـة والتحول الغذائي .

٣-٤-التغذيـة : حيث يؤثر نوعية وكمية الغذاء المقدم قبل وأثناء الاختبار على درجة تحمل الكائن المختـبر لتأثيرهـا علـى الوظـائف الحيويـة و الفسيولوجية بالجسم فزيت الزيتون كدهن يرفع درجة تحمل الذباب المـنزلي لمركب الددت وزيادة المحتوى النتروجيني تزيد وزن الجسم وفترة حياته كمـا بيرقات الدرويسفولا و بالتالي تزيد مدى تحملها لمركب الددت .

٣-٥-تأثير الكثافة العددية للكائن (Population density) فتؤثر بطريق غير مباشر على مدى استجابة هذه الكائنات للمركب المختبر فالكائنات المرباه في مجموعات كبيرة ومتزاحمة تؤدى لتكوين أفراد ذات وزن وحجم أقل فعامل الزحام يعمل كمنبه (Stimulate) مستمر فارتفاع التحول الغذائي و بالتالي صغر وزن وحجم الجسم وقلة مقاومة مما يسهل ارتفاع وسرعة تأثره للمركب.