الباب الخامس
التحليل البيولوچي

الفصل الأول

الاختبارات البيولوجية Biological Testes

فقد يكون بمادة العلف مكون ضار أو سام أمكن التعرف عليه لكن بدون تأكيد ، فقد تتداخل بعض الشوائب بمادة العلف مع هذا المكون ، أو تضلل ظهوره ، أو تضخم من كميته ، أو قد تظهر الشوائب (حتى على أحدث الأجهزة المستخدمة) بدلاً من المكون المدروس وتعطي نتائج مضللة ، أي موجبة رغم أنها في الواقع سالبة ، وفي هذا الشأن لابد من تأكيد النتائج Results Confirmation بعمل مشتقات بتفاعل هذا المكون (لو وجد) مع كيماويات تضاف إليه في تفاعل معلوم ، ثم الكشف عن المشتقات الناتجة ، أو بالكشف عن المكون المراد فحصه بأكثر من طريقة معاً في آن واحد ، سواء طرق طبيعية كيماوية أو طبيعية كيماوية مع طرق بيولوچية . وقد يكون هذا المكون غير متعرف عليه ولم نصل بعد لطريقة لفصله أو تقديره والكشف عنه ؛ لذا تجرى عليه إحدى الاختبارات البيولوچية لتأكيد أثره السام أو الضار ، لو كان له مثل هذه الآثار .

ومن الاختبارات البيولوچية :

١ ـ اختبار الجلد :

يجرى عادة على الأرانب أو الجرذان بإذابة المركب أو المكون أو مستخلصه في مذيب معين مثل خلات الإيثايل النقية ، ويعرّض لجلد الأرنب المحلوق سطحياً ، أو يحقن تحت الجلد .

ومن مشاكل هذا الاختبار هو اختلاف حساسيته طبقاً لنقاوة المذيب ، وتداخل أثر المكونات الطبيعية للعينة والتي تنتقل مع المذيب عند استخلاص المكون المدروس وتؤدي لتأثير مضاد Antagonist للمركب المدروس .

٢ ـ اختبار جنين الدجاج :

في حالة اختبار مركب ما يجرى اختبار جنين الدجاج Chicken Embryo Test أو جنين البط ، وذلك على بيض مخصب من عشوش نظيفة بعد فحصه ضوئياً بمصباح فحص البيض Egg Candling Light قوه ٦٠ وات ، وذلك لاستبعاد البيض ذي الخلايا الهوائية التي

ليست في موضعها أو المهتزة ، وذي البقع الدموية أو المشروخ ، أو ذي القشرة المعيبة وغيره من الشذوذ . كما يوضع البيض في كراتين جديدتين ، ويكون البيض خالياً من Pullorum typhoid ، وسالباً لـ Mycoplasma gallisepticum ، وأن يكون وزن البيضة ما بين ٥٩-٦٧ جم ، وأن يكون الوقت بعد الوضع أقل من ٤٨ ساعة ، ويخزن على ٦٠ف (١٥,٥م) ، ورطوبة نسبية ٨٠٪ ، وأن تكون خصوبته أعلى من ٨٥٪ ، وأن يكون من قطيع غير معامل بالمضادات الحيوية أو مركبات زرنيخية أو نيتروفيورازونات .

بعد الفحص الضوئي للبيض يعلم على موضع الخلية الهوائية بقلم رصاص . يقسم البيض عشوائياً إلى مجاميع حسب العدد المطلوب لكل مستوى من العينات التي ستحقن . يرقم البيض كودياً للإشارة للتاريخ والمعاملات . استخدم قلماً رصاصاً صلباً نمرة ٣ لتفادي التلويث به عند استخدامه . يعمل ثقب بقطر ٥م في مركز الخلية الهوائية بحيث تخرج القشرة للخارج بواسطة ثاقب Drill البيض ذي قاطع نمرة ١٧٨ . أزل غشاء القشرة المرئي بملقط معقوف طول ١١٥م . باستخدام محقن ١-١٠٠ ميكرولتر وإبر منحنية (بطول ٢٥-٣٧م مقاس ٢٢-٢٧) تعمل بزاوية ٩٠° . وزع كمية العينة المطلوبة على غشاء البيض مع الحرص بألا تخترق الإبرة الغشاء . في الحال سد الثقب بقطعة من شريط السيلوفان اللاصق عرض ١,٢٥سم بحيث تغطي الثقب وأقل ما يمكن من باقي الخلية الهوائية . اترك البيض بدون إزعاج في وضع رأسي (الخلية الهوائية لأعلى) لمدة ساعة حتى تنتشر المادة . ضع البيض في مفرخة Incubator - Hatcher واضبط حرارتها ورطوبتها (٩٩,٧٥° ف أو ٣٧,٤م ، ٦٠٪ رطوبة نسبية) . طهر المفرخة في الحال بالتدخين بعد ملئها بالبيض باستخدام مبخرة . التقليب آلي كل ساعتين أو يدوي على الأقل مرتين يومياً خلال ١٧ يوماً تحضيناً ويفحص ضوئياً في اليوم الرابع ثم يومياً بعد ذلك. يزال البيض الرائق والأجنة الميتة للفحص . سجل العمر ومظهر الجن كله لكل اختبار ومحلول مقارنة (كونترول) خلال فترة التحضين . في اليوم السابع عشر يوضع البيض في قسم الفقس ، حيث إن التقليب لم يعد هاماً أو مطلوباً ، وتضبط الحرارة والرطوبة النسبية المفضلة ودخن واترك البيض للفقس والجفاف (في اليوم ٢٢ أو ٢٣) . افتح وافحص كل البيض غير الفاقس وافحص الكتاكيت الفاقسة وسجل الملاحظات .

عادة يذاب المركب المدروس في مذيب كالكحول المطلق على أن تحقن الكونترول بالمذيب فقط ، ويجرى الاختبار على ١٠٠ بيضة عادة لكل تركيز على أوقات مختلفة،

أي تكرر ٤ مرات في كل مرة على ٢٥ بيضة / تركيز . ترسم منحنيات العلاقة مابين التركيز ولوغاريتم نسبة النفوق ٪ . وتقدر (Lethal Dose (LD_{50}) أي الجرعة المميتة لنصف عدد البيض .

وعادة يجرى تقدير نسبتي الخصوبة والفقس بوضع حوالي ٣٠ بيضة بدون حقن مع كل تحليل . وهناك نظام متفق عليه للحقن من حيث الكميات كما يلي :

عدد البيض	الكمية المحقنة		٪ نفوق	المادة المحقنة
	ميكرولتر	ميكروجرام		
٢٠	٢٠	٠,٢٠٠	١٠٠	المحلول مراد اختباره
٢٠	١٠	٠,١٠٠	١٠٠	
٢٠	٥	٠,٠٥٠	٩٠	
٢٠	٢,٥	٠,٠٢٥	٥٠	
٢٠	٢٠	٠,٢٠٠	١٠٠	محلول قياسي مشابه للمراد اختباره
٢٠	١٠	٠,١٠٠	١٠٠	
٢٠	٥	٠,٠٥٠	٩٠	
٢٠	٢٠	—	٢٠	المذيب المستخدم
٢٠	١٠	—	١٠	
٢٠	٥	—	١٠	
٣٠	—	—	٢٠	كونترول غير محقون

ويتم تسجيل الشذوذ في الأجنة من حجم ووزن وقصر الأرجل والأوديما والنزف ، مع مقارنة البيض المحقون بالمحلول المراد اختباره بالبيض المحقون بمحلول قياسي Standard للمحلول المراد اختباره ، وفي الاختبار الموجب يلاحظ عدم الفقس بعد ٢٠ يوماً تحضيناً ، وفي الجرعات المناسبة يلاحظ عدم نمو الجنين بعد ٤ أيام . ولقد أعطى هذا الاختبار البيولوجي ارتباطاً ١٠٠ ٪ مع الاختبار الكيماوي في كثير من المركبات .

٣ ـ تجرى الاختبارات البيولوجية : تجرى هذه الاختبارات كذلك على يرقات سمك الحمار الوحشي Zebra Fish Larva ، أو خلايا الإنسان أو الحيوان ، أو الأميبا والحشرات والبكتيريا وغيرها كثيرا .

والأمثل هو الجمع بين طريقة بيولوجية مع أخرى كيماوية طبيعية . ولا غنى أساساً عن التحليل الطبيعي الكيماوي حيث إن الطرق البيولوجية أقل حساسية وأقل تخصصاً ، كما تحتاج وقتاً وجهداً ، فاختبار جنين الدجاج أو البط يحتاج عدداً كبيرا من البيض ، وفترة طويلة حتى يفقس البيض ، وخطوات عملية تستمر فترة التفريخ وحتى الفقس الذي يحتاج شهراً في البط ، بينما في اختبار الجلد Dermal Necrosis Test للجرذان أو الأرانب فإنه قد لا تظهر السمية الجلدية قبل عدة أيام ، بالإضافة للتداخلات الكثيرة للمذيب ولمكونات المستخلص الأخرى وللاختلافات الفردية .

وليس نفياً لما سبق ذكره من أن الطرق البيولوجية أقل حساسية وأقل تخصصاً عن الطرق الطبيعية الكيماوية ، فإن الطرق البيولوجية يؤكد الكل عدم تخصصها ، لكن يثبت البعض حساسيتها الكبيرة خاصة لمركبات سامة بعينها أو سامة خلوياً Cytotoxic ، فقد استخدم زهور نبات الدخان واستخلص منها حبوب اللقاح ، وأضيفت تركيزات مختلفة من السموم الفطرية المحتوية على مجموعة 12, 13- Epoxytrichothecene (وهما التوكسينان T_2 ، Diacetoxyscirpenol) إلى معلق حبوب اللقاح وتم تسجيل النسبة المئوية لتثبيط إنبات حبوب اللقاح بتأثير التوكسينات فوجد أن هذا الاختبار حساس جداً لجرعة بلغت ١ ٪ من الجرعة المميتة لنصف أجنة البيض في اختبار جنين الدجاج المعاملة بالتوكسين Ver-rucarin ، كما كان حساساً لدقة ١ نانوجرام من كل من التوكسينين المذكورين سابقاً ، بينما لم يعط أي حساسية للأفلاتوكسينات أو الأكراتوكسينات أو الإستريجما توسيستين . وهذا الاختبار الأخير يوضح أهمية وبساطة بعض الاختبارات البيولوجية الذى من السهل إجراؤها في المعمل دون تعقيدات وهي مكملة للاختبارات الكيماوية .

وقد استخدمت خلايا طلائية الإنسان كذلك لدراسة السمية الخلوية لعدد ٣٣سم فطري لمقارنة دقة الاختبار الخلوي بالتقدير الكروماتوجرافي رقيق الطبقات ، وثبت وجود اختلافات في مستويات اكتشاف هذه السموم ، وقد كان اختبار السمية الخلوية Cytotoxicity test أكثر حساسية بشكل معنوي عن الكروماتوجرافي رقيق الطبقات خاصة للتريكوثيسينات وأوصى باستخدامه في غربلة مستخلصات الأعلاف الحيوانية للبحث عن سموم فطرية غير معروفة .

المراجع :

- AOAC (1965) Association Of Official Agricaultural Chemists , 10 th Ed . , Washington .

- Robb , J. & Norval , M. (1983) Appl . Environ . Microbiol ., 46 : 948 .

- Siriwardana, T.M.G. &Lafont, P. (1978) Appl . Environ Microbiol., 35 : 206 .