

الباب الثالث

التقييم الحيوي

لمتبقيات السموم والملوثات البيئية

obeikandi.com

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 متبقياتا من خلال مدى تقدير مدى استجابة هذا الكائن المختبر تحت ظروف تتلاشى فيها كل العوامل الأخرى المؤثرة في استجابته عدا العامل موضع الدراسة ، حيث أن أي تغير في ظروف التجربة يؤدي بدوره للتأثير على العمليات الفسيولوجية و البيوكيميائية و التي تؤثر بدورها على النسبة المئوية للموت (Mortality : Death %) .

والهدف من التعقيم الحيوي :

- تقييم كفاءة متبقيات أو مركبات سامة مختلفة بغرض التفضيل بينها (Screening) حيث يتطلب التخليق المستمر للمركبات السامة والعقاقير خاصة الأدوية والمبيدات تقييم حيوي لها لتعين أنسبها مع عدم وجود تأثيرات جانبية ضارة له (Side effects) على الصحة العامة (Public Health) أو الحيوانات المستأنسة وحيوانات المزرعة .
- فتستخدم تجارب التعقيم الحيوي (Bioassay) لمقارنة مجموعة من المركبات السامة من حيث قوتها وتخصصها على آفة معينة لاختبار 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 التشريحية و النسيجية (Histological exam) والبيوكيميائية (Biochemical index) ليحدد منها نوعية التسمم الناتج (معدي-لامس-عصبي-تناسلي-تنفسي...) .

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

□ التعرف على تركيز مركب أو متبقيات مركب في العينة وذلك من خلال تقدير النسبة المئوية للموت و المصححة بمعادلة أبوت (Abbt.s Formula) تم تعديل القيمة إحصائيا بطريقة فيني حيث يتم تعريض إحدى الأنواع الملائمة والحساسة لمتبقيات هذا المركب السام وتقدير نسبة الموت و التي تترجم بعد ذلك إلى تركيز (Concentration) من خلال منحني الموت و الذي تم عملة باستخدام سلالة الكائن المختبر الحساس ونفس المادة النقية (pure ingredient) لهذه المتبقيات والحصول منها على علاقة خطية (Linearity relationship) بين تركيزات المادة النقية المتدرجة ونسب الموت المقابلة لها وغالبا ما تجرى يوميا لملامشة التغيرات .

□ وتجرى تجارب التعقيم الحيوى لدراسة التسمم الحاد بتعريض السلالة الحساسة من الكائن المختار لجرعة واحدة مفردة (Single dose) وهو ما يختلف عما يحدث فى البيئة الطبيعية : تسمم مزمّن (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 حيويًا طوال فترة التعريض (Bio transformation : Metabolism) أو تحولت بعوامل بيئية طبيعية (Trans formation) بالحرارة و أشعة الشمس والرطوبة كذلك يلاحظ عدم الفترة الحقيقية بين الجرعة و التي تليها وكمية كل منها ومعدل النفاذ والامتصاص لها ومستوى درجة تمثيل الجسم لها و الإخراج للمركب وطرحه خارج الجسم .

□ وقد يطلق مصطلح التقييم الحيوي الدقيق (Micro bioassay) وهنا يتطلب العمل دقة عالية في عمليات استخلاص وتنقية المتبقيات لعزل جزئيات المركب فقط المراد تقديرها كميًا عن طريق التقييم الحيوي بعيدا عن المواد المتداخلة معه .

العوامل المؤدية لإختلاف طرق التقييم الحيوي :

تختلف طرق التقييم الحيوي لمتبقيات السموم تبعًا لنوعية المركب السام المختبر و تجهيزته (Formula) و نوع الكائن الحي المختبر كالحوانات الثدييه (فئران-أرانب-خنازير غنيا-قرود) أو عنكب 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 :

فعلى 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 على السطح المعامل فتستخدم مع الكائنات الزاحفة أو التي تسير على 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 الأهل تشبيها 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 أن يتراوح وزنها بين ٢٠٠-٣٠٠ جرام و يجب وألا يزيد هذا التفاوت في الوزن عن \pm ٢٠ % عن المتوسط العام لأوزانها .

وبالنسبة للارانب بفضل النوع ألبينو (Albino) و يجب أن يتراوح وزنها بين ٢-٣ كيلو جرام في حين يتراوح وزن خنازيرغنيا (Guinea pig) بين ٣٥٠ - ٤٥٠ جم .

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

ويلاحظ أن التغير في أي عامل مما سبق يؤدي لتغير في درجة الاستجابة (Response) أي في نسبة الموت .
كذلك يلاحظ تفضيل الأنواع سهلة التربية والمعاملة وسريعة التكاثر والاستجابة العالية لأي تأثير .

٤- إختلاف طرق المعاملة (Method of Application) :

تؤدي إختلاف طرق المعاملة بدورها لاختلاف في 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 يتسنى 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 : قيء (Vomiting) وتفيد مع السموم المعدية التأثير (Stomach poison) .

□ أما المعاملة عن طريق الرش (Spraying) للأسطح أو الأتسجة المختلفة و التي يتغذى عليها الكائن المختبر أو يمشی عليها (لاختبار السموم بالمامسة يستخدم برج بوتنر (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 (Topical 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 (ندييات)
- توقف القلب (ندييات)
- 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 إختبار العمر والجنس والوزن المناسب .
فنتستخدم الإناث أكثر من الذكور رغم أن الذكور أكثر حساسية واستجابة تجاه المركب المختبر نظرا لاعتماد مستوى السمية (الاستجابة) لكمية السم / وزن الجسم
وفي 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 الإختبار ودقة النتائج المتحصل عليها ونقص الخطأ التجريبي .
ويراعى عند إضافة المادة السامة المختبرة إلى البيئة الغذائية للكائن فإن كمية ونوع الغذاء ومدى إمكانية الحصول عليه وبصورة جيدة قد تؤدي 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 تؤدي لحدوث تحولات للمركب (Trans formation)

كذلك قد يؤدي عدم إجراء عملية الاستخلاص والتقية للمركب المختبر وعزلة عن أي مركب أخرى متداخلة معه إلى اختفاء تأثيره أو تتداخل معه في عملية التقييم وبنفس الطريقة التي تتداخل بها المواد المستخلبة . كذلك عدم إزالة متبقيات المذيب المستخدمة في الاستخلاص قد يكون لها تأثيرها في الإثاث ولهذا يراعى تثبيت نوع المذيب في كل معاملات الاختبار لتثبيت عملية الاستخلاص في كل مرة .

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

و التقية لمعاملة الكائن أي 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 ان 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 مفردة 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 تبعاً إلى

١- تقييم حيوي كيميائي أو شبه كيميائي (Qualitative : Semi quantitative Bioassay) حيث يتم إجراء التقييم الحيوي بدون عمل منحنى قياس يومي وتكون الكائنات الحية موضع الاختبار والمرباة تحت ظروف ذاتية مما يؤدي بدوره 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 المستخدمة في الغذاء الأدمي أو كعلف للحيوانات .

٢- التقييم الحيوي الكمي (Quantitative Bioassay) :
وقد يطلق عليه التقييم الحيوي الدقيق (Micro bioassay) ويتطلب حساسية ودقة كبيرة في العمل والقياس والحساب وذلك من حيث :

- دقة عمليات الاستخلاص والتنقية لمتبقيات المركب لعزلة عن المواد المتداخلة مع متبقيات المركب موضع الدراسة والتي قد يكون لهذه الشوائب المتداخلة أيضاً تأثير سام ضمن نتائج السمية : الاستجابة الكلية (Total Toxic Response) .

- الدقة في اختبار أفراد الكائن الحي المختبر سواء كان حيوان ثديي أو حشرات أو أكاروس أو نيماتودا فيكون ممثل وبدقة للمجموع المأخوذ منه وتمثيل من حيث السن والعمر والوزن والجنس مما يتسنى معه الحصول على درجة استجابة عالية .

- استعمال الطريقة الأنسب في المعاملة بالنسبة لكل نوع والكائن المعامل الأكثر تخصصاً .

- 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 : التتكرز (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 نقوب على العائل فإنه يكتفي بعد النقوب التي دخلت منها هذه الآفة أو خرجت منها أو من خلال تشريح الثمرة لزيادة مستوى دقة الفحص وهنا تسجل النتائج في مراتب تقسيمية كما يلي :

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 وشدها دون الحاجة لتقدير عدد الآفات نفسها وهو ما يستخدم بنطاق واسع في تجارب التقييم الحيوي للمسوم الفطرية والبكتريا والنيماطودية لسهولة تقييم مظهر الإصابة عن تقييم عددها لمجهري 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 مملوءة بالإصابة+ تغطية لقمة الثمار +

الساق الرئيسي عالية بعض المستعمرات حتى الصف

الثالث من الورق .

المرتبة السادسة : مستعمرات كثيفة تغطي الساق وحتى سطح التربة

المرتبة السابعة : 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 تواجهه المتفرقة والمتعددة ليُمثل بصدق أفراد مجموعته في الطبيعية ثم يربى بالمعمل لعدة أجيال وبطريقة نموذجية يتوفر معها أفضل ظروف للنمو والتطور والتكاثر من حيث كمية ونوعية البيئية للغذائية المقدمة لها ودرجة الحرارة المثلى للملائمة لنموها وتكاثرها (ففي الفئران تكون $23 \pm 3^\circ \text{C}$ و بالأرانب أليينو $20 \pm 2^\circ \text{C}$ ودرجة رطوبة نسبية تتراوح بين 30- 70% (WHO) وحتى يزداد مجموعها وتعود على الظروف المعملية .

ويراعى جمعها من مناطق لا يستخدم فيها المركب المختبر من قبل أو على الأقل استخدم ولكن 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 التي 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) ومرياة لعدة أجيال بدون للمركب المختبر أو لمركب آخر من نفس مجموعته الكيمائية حتى يتسنى للباحث أثار جيد للمقارنة (Control) أو لعدة أجيال يعتمد عليها .

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

و تختار الأفراد الأصحاء وتستبعد المريضة أو المشكوك في أمرها كما تستبعد الإناث التي تأكل أولادها أو تطردها عند قلّة الغذاء أو اختلاف 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 يوميا و غسيل أواني التربية بالفينك .

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

حيث يتم إختيار الأفراد المتجانسة (Homogenized individual) من حيث تماثلها في النوع والجنس والعمل والطور والوزن والحجم وطريقة التربية ونوعية وكمية الغذاء و ذلك تبعا لنوع الاختبار المستخدم يعطى معه نتائج أكثر دقة وحساسية .

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

كذلك يراعى إختيار الأفراد الأصحاء البالغين خاصة في حالة الإناث 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 الانسلاخ أو الأطوار اليرقية و التي ستسليخ قريبا ويفضل إجراء الاختبار على الطور الذي تجرى عليه عملية المكافحة (Control) لتكون نتائج التقييم الحيوي أقرب ما يكون المواقع .

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

وبالنسبة لعدد الكائنات المستخدمة بكل مكرر (Replicate) أو معاملة (Treatment) فيفضل ألا يقل عن عشرة كائنات خمسة ذكور وخمسة إناث وفي 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 \times ١٠ حيوان بكل معاملة = ٣٠ كائن مختبر) وذلك بغرض تقليل الخطأ التجريبي في النتائج المتحصل عليها عند تحليلها إحصائياً .

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 عليه وفي استخدام أي أداة (Vichel) أو مذيب مثلاً للمسلعة في إذابة المادة المختبرة فإنه يجب عمل مجموعة كونترول أخرى خاصة بالمذيب لطرح أثره من القيمة النهائية للاختبار فربما له تأثير ضار على الكائن المختبر موضع البحث .

كذلك قد تؤخذ مجموعة مقارنة أخرى ثلاثة تسمى بالمجموعة التابعة (Satellite) إذا ما احتاجت ظروف الاختبار ذلك .

وتوجد مجموعة مقارنة رابعة إذا ما استدعى الاختبار استخدام مادة مخدرة أثناء المعاملة للحد من النشاط الحركي الزائد للكائن المختبر لبيان تأثيرها فقد يؤدي 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 ١٦،٨،٤،٢،١ أو ٢٧،٩،٣،١،٠... وذلك لارتباط الأثر السام بقيمة لوغاريتم الجرعة (التركيز) بدرجة كبيرة .

ويجب و أن يكون حجم المذيب المستخدم بكل معاملة ثابت حتى يتسنى تقليل أو ملاحظة 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 الاختبار ليتسنى له الانتشار 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 الاختبار .

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- التحذير (Anesthetization) :

قد تستخدم عملية التحذير 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 وثبتهها.

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

قد يستخدم تيار مستمر من ثاني أكسيد الكربون أو مادة الإثير أو التعريض لدرجات حرارة منخفضة كما يتم التحذير 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 في 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 :

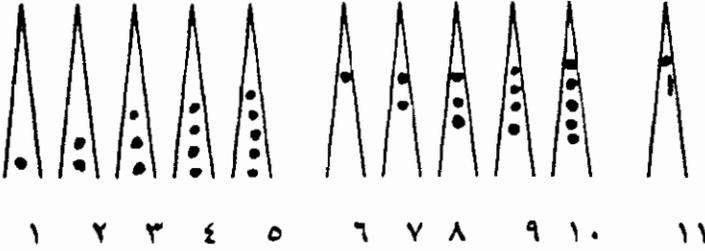
نسبة الموت الفعلية (المصححة) =

% 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 الإختبار :

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



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 تبعاً لنوع الكائن المختبر وجنسه ونوعه وطوره ووزنه ومدة التعريض وطبيعة المركب المختبر وتركيبه الكيميائي وطريقة تأثيره وإمكانيات العمل المتاحة ومستوى الدقة المطلوب في النتائج ومدى توفر الظروف البيئية المناسبة من غذاء وحرارة ورطوبة أثناء الاختبار وقبله وبعده حتى لا يؤثر إحداهما كعامل خارجي يتدخل في نسبة الموت المتحصل عليها والتي تزداد تدريجياً 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 لآخر 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 احتمالها (Tolerance) .

١-المعاملة القمية : الموضعية (Topical Application) :

أكثر الطرق شيوعا وانتشارا لسهولة إجرائها ودقتها وإمكانية تطبيقها على عدد كبير من الكائنات وفي نفس الوقت استهلاك أقل كمية من المركب السام مع دقة النتائج المتحصل عليها .
وتتم بوضع قطرة من محلول المركب السام المختبر معلوم حجمها بدقة وتتراوح بين ٠.١ - ٢٠ ميكرولتير وذلك على منطقة حساسة من سطح الجسم كالرأس وملحقاته أو منطقة الصدر .
ويتم ذلك باستخدام ماصة ميكرولتيرية (Micro pipette) أو بجهاز الميكروأبليكاتور (Micro applicator) المعد لذلك وهو حقنة دقيقة يتحرك زراع مكبسها لمسافة بمدلولية التركيز المعلوم والتي تنفق وحركة الميكروميتر فتخرج قطرة ذات حجم ثابت ومعلوم من أبرة الدقيقة (needle)

الطويلة المثبتة بنهاية المحقن حيث يتناسب حجم هذه القطرة مع الكمية
المعامل بها طرديا (حجم × تركيز = كمية)

وتختلف مكان المعاملة باختلاف نوع وحجم الكائن المختبر ففي حالة
الفئران يتم وضعها على منطقة الجزع (Trunk) أو فوق الكتف بعد حلق
(sheaving) بمسافة تبلغ ٤,٥ سم² أما بالأرانب فتحلق منطقة البطن أو
الصدر وتعامل .

وقد يتم عمل عجينة من المركب يدهن بها المكان ثم يغطى باليولي
إثيلين أو المطاط أو شريط لاصق وهنا يجب عمل كونترول خاص للشريط
أو الرباط المطاط أو اليولي إثيلين خاصة مع اختبارات السمية اللامسة للجلد
لاحتمالية تأثيرها على الحساسية أو الالتهاب الجلدي .

أما بالنسبة للكائنات المختبرة الدقيقة كالحشرات فيتم وضع القطرة على
السطح البطني للجسم حيث الإسترنات رقيقة وغير مغلظة يقل بها الشيتين
خاصة بمنطقة الصدر كما بالصرصار أما بالكائنات الأبق كالجاسيد
والبعوض فتوضع القطرة فوق الرأس أو أجزاء الفم أو قرون الأستشعار 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 ويملا بها المحقن ثم يضبط المؤشر على إحدى الأحجام وليكن ١ ميكروليتر 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) :

وهي الطريقة الوحيدة التي يتم فيها التأكد من كمية الجرعة الداخلة لجسم كل كائن معامِل حيث يذاب المركب المختبر وبالتركيز المطلوب في المذيب المناسب أو المادة الحاملة المناسبة كالزئبق 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 إبره دقيقة حادة حتى لا تحدث نزيف (Bleeding) في موضع وخذاها ويتم الحقن ببطيء شديد

ويختلف مكان الحقن باختلاف نوع الكائن المختبر وطوره :

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

• injection : IS)

• وفي 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 .

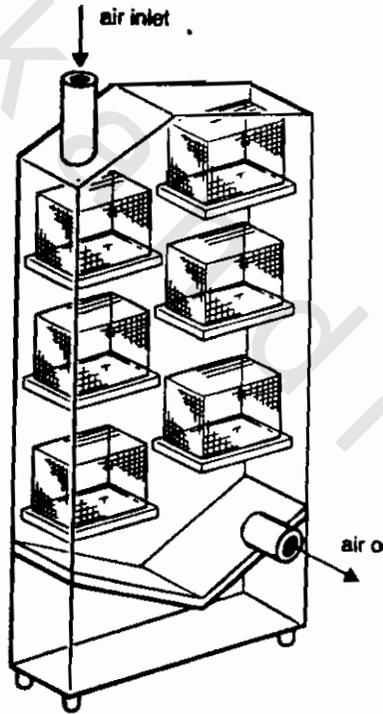
ويعاب على طريقة الحقن ما يلي :

- بطيء وصعوبة إجرائها خاصة مع الأعداد الكبيرة مما يحد إنتشار استخدامها .
- احتمالية حدوث التزيف 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 ايروسولي حيث يتم حساب الكمية المستنشقة بالمليجرام / م^٣ / ساعة أو في صورة ضباب (Fog) وهنا يتم استنشاق تيار هواء ساكن في غرفة (Static Air Flow) يتم فيها حفظ الكائن أو اسطوانات يتم تفرغها من الهواء مع إمكانية التحكم في الضغط داخلها وهنا يكون الجهاز التنفسي هو المتأثر و الشكل رقم (٣-٢) يوضح نماذج لغرف الاستنشاق (Inhalation chambers) فنتمكن باستخدام غرف الاستنشاق من تعريض الحيوان أو المواد البشرية إلي جو ظروفه سبق تقديرها بنقطة 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 (Total-body system) : حيث يتم تعريض
 الجسم كله سواء أكان لحيوان تجريبي أو بشر .
 ولهذه الطريقة مميزاتها وعيوبها فتعريض الجسم كله يؤدي
 لامتصاصه نتيجة التلوث كما يؤدي تداخل سلوك الكائن نفسه مثل ما
 يحدث عند لعق الحيوان لجلده (Licking the fur) وهنا فإن أخذ
 المركب المختبر عن طريق الفم يأخذ مكانه و بكمية معقولة خاصة
 مع المواد التي يكون فعلها جهازيا وهو ما يوضح أهمية و
 خصوصية نظام تعريض الرأس أو / و الأنف مع طرق دراسة
 الأيروسولات ، جدول رقم (٣-١) .



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

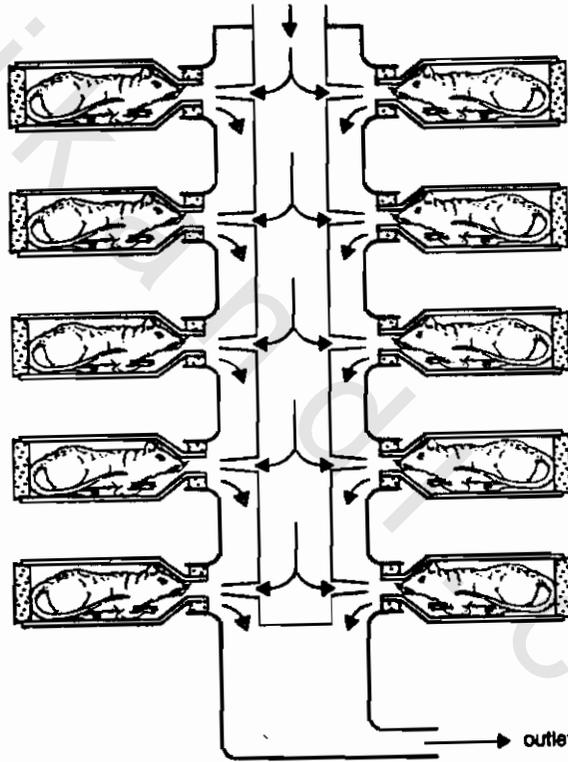
ومن وجهة الأيروديناميك فإن غرف الاستنشاق الأسطوانية (Cylindrical chamber) تعتبر غرف نموذجية لعدم وجود أركان مينة بها و تماثل معدل السريان بكل مناطقها و بالتالي تساوي تركيز المادة المختبرة في كل أجزائها و من هنا تكون كل الحيوانات معرضة لنفس التركيز المستخدم خاصة مع الايروسولات والتي تعد مادة ترسب و إستقرار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

و أغلب الغرف يكون لها أربعة أو ست أوجه و السطح و القاعدة سطحه أو بشكل هرمي و هنا تكون ذات ستة أوجه و قاعدة مثلثة و سقف مخروطي بهدف التأكد من أمثلية التوزيع المتوقع للمادة (الجو) المختبرة و غالبا ما يدخل الهواء من قمة الغرفة و يصرف 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

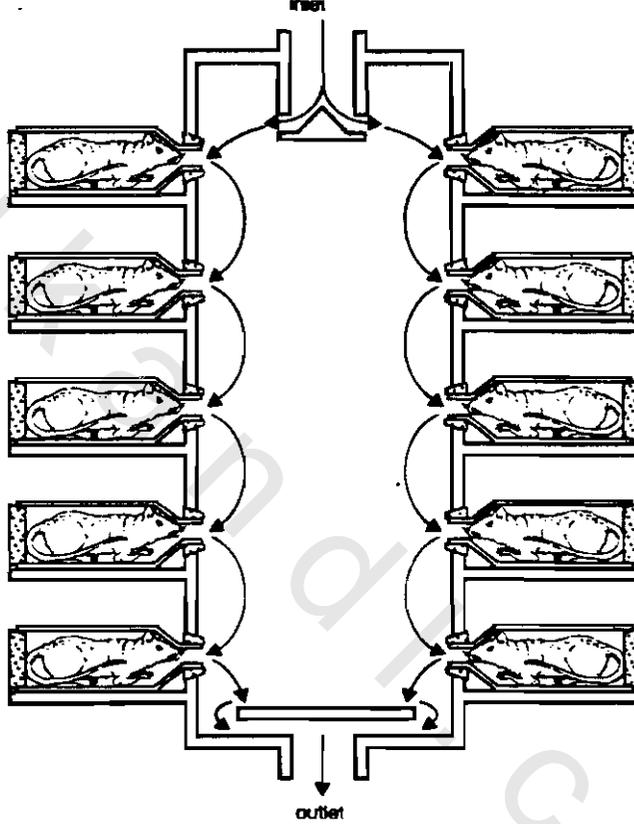
تعريض الرأس أو / الأنف	تعريض الجسم كله
يتم التعريض بدون تلوث الجسم بالمادة المختبرة. لا يمكنها التحرك بحرية لصغر المكان نسبيا . تحتاج لكمية صغيرة من المادة المختبرة . يمكن زيادة أو نقص التركيزات بسرعة.	تمتاز باستخدام عدد كبير من الحيوانات تعريض تلقائيا . يتحرك الحيوانات بحرية تامة و بدون أي ضغط تظهر الأعراض السريرية بسرعة. مناسبة للدراسة علي المدى القصير و الطويل
ضغط و عدم راحة من تثبيتها . لا تلاحظ السلوك و الأعراض السريرية بسهولة. تعريض عدد كبير ليس عملي .	عيوبها : سطح الجسم كله معرض . تحتاج الي كمية كبيرة من المادة المختبرة. أنالاف مدى 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 تأمين عالية نسبيا

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 و عنق الحيوان مثبت بداخلها ويساعد في ذلك وجود موقف سطح (Stopper) بحيث يقل الفتحة جيدا ويمنع سحب الحيوان لرقبته للخلف (Retracting) فيوقف تسرب الهواء المعامل .



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

أما الغرفة ذات الحائط المزدوج ، شكل رقم (٣-٤) و تتميز بأن الحيوانات المعرضة فيها دائما ما تستنشق هواء جوي طازج أول بأول وهو ما لا يتوافر في نظام الحائط المفرد حيث تستنشق الحيوانات المعرضة هواء تم استنشاقه من حيوانات أخرى 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 كيميائيا وقوي واه قوة احتمال عالية إلا أنه مكلف من الناحية الاقتصادية. و قد تكون من الألومنيوم فيكون أقل تكلفة إلا أنه غير خامل كيميائيا . أما في حالة تصنيعة من البلاستيك فيتميز بخفة الوزن و الشفافية و سهولة تداوله لكن يعيبه نقص المتانة و الضعف علاوة على الكهربية الاستاتيكية و حساس للتخريب بالكيماويات

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

▪ و بالنسبة لـحجرة 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 على عدد كبير من الحيوانات و أكثر من ذلك فإن تركيزات الغاز المستنشق بالحيوانات و نواتج التمثيل و الالتهاب المختلفة للبراز و اليورين تصبح غير مقبولة و هو ما يعود بنا إلى 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 للكثربة 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 ٢٠-٢٤م 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 أعلى 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 كيميائية أو بيخزر السوائل أو تطاير المواد الصلبة .

▪ ويختلف توليد جو الاختبار للغازات و الأبخرة في أنظمة التعريض الاستاتيكية : فهو نظام مقفل لا يوجد به تجديد حيث يقلل المحتوى الأوكسجيني به تدريجيا نتيجة تنفس حيوانات التجريب وهو بدوره ما يؤدي لارتفاع ثاني أكسيد الكربون و الرطوبة النسبية بدرجة غير مقبولة و هنا يجب توافر وسائل لقياس استهلاك الأوكسجين 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 المسائلة المتطايرة بتقديم كمية معلومة من الغاز أو المادة المسائلة 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 بالملل (V_g) / حجم النظام بالمتر (V_{ns} x 1000)

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

$$\text{تركيز الغاز (مليجرام / م}^3) = \frac{\text{حجم الغاز (مليج) / حجم النظام (لتر)} \times 1000 \times V_0}{(24.21 / \text{مول})}$$

• 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 نوبان ...) وهو ما يجعل توليد الغاز في جو الاختبار صعب جدا أو من عملية طبيعية (تحليل كهربى Electrolysis : أو انهيار حراري Thermal decomposition : تفاسعات ضوء كيميائية Photochemical reactions : أو التأين : Ionization) .

• و عموما هناك طرق مختلفة لتوليد جو الاختبار و أكثرها شيوعا الحقن المباشر بمائل عالي التطاير أو تذرير السوائل فتبخر بعدها بسرعة أو تبخير المادة علي سطح ساخن أو الانتشار من خلال أنبوبة منفذة.

و يعبر عن تركيز المادة في جو الاختبار بطريقتين :

- 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 (GLC : Gas Chromatography) أو بالكروماتوجرافي الغازي فائق القدرة (H.P.LC : High Performance Liquid Chromatography) أو بالأشعة تحت حمراء (IR : Infra Red) أو التحليل اللوني (Colorimetry or Spectro) أو كاشفات أو مستشعرات متخصصة (Detectors) لذلك أو (photometry) طرق التحليل الكيماوية الكلاسيكية .
- أما بالنسبة للإيروسولات 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 الإيروسولات المتعرض لها البشر و لهذا تستخدم في غالبية دراسات السمية بالاستنشاق .
- و من الأهمية بمكان في دراسات الاستنشاق بالإيروسولات توليد جسيمات يمكنها الدخول و التوزيع في مسار الهواء و هو ما يتوقف بدورة علي حجم الجسيم : القطر الهندسي أو القطر الأيروديناميكي 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 الأيروديناميكي 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 أيروديناميكي ٥ ميكروميتر له نفس معدل الترسب في الهواء لكرة لها قطر ٥ ميكروميتر و كثافة ١ .
- أما الجسيمات الهفو : الذغبية (Fluff) و التي لها مساحة سطح كبير و كثافة منخفضة يكون قطر الأيروديناميكي لها صغير جدا بينما القطر الهندسي كبير نسبيا . و لهذا فقطع الرصاص الصغيرة ذات

الكثافة العالية و مساحة المسطح الصغيرة يكون تشبثها و مسكها بالهواء قليلة .

• أما بالنسبة لزيادة الشحنة الكهروستاتيكية (Electrostatic charge) و التي تكتسبها جسيمات الإيروسول عند احتكاكها مع السطح الداخلي لمولد الإيروسولات فلها تأثير كبير على سلوك الجسيمات في مسارات الهواء و درجة التجمع و الترسيب . و يتأين هواء الإيروسول فلإن الشحنة الكهروستاتيكية تتبادل جزئيا .

• ويتم الفحص لتقدير الاستجابة (نسبة الموت) بعد ٢٤-٤٨ ساعة من التعرض .

• و تدخل جزئيات المركب المختبر خلال الفتحاح التنفسية (الأنف أو الثغور التنفسية) ثم تمتص بالأماكن المختلفة للجهاز التنفسي حيث تسير مع تيار الدم لمكان تأثيرها (الأعصاب -نظام إنزيمي خاص بعملية التنفس)

• وقد يستخدم تيار هوائي متحرك air dynamic flow حيث يوضع الكائن بغرفة مزودة بتيار هوائي حيوي على مكية ثابتة ومعلومة التركيز من المركب المختبر ويجب الأخذ في الإعتبار أن السمية الناجمة هي محصلة السمية بالاستنشاق عن طريق الجهاز التنفسي وبالملامسة للجلد (أو الجلد)

• وهنا يلاحظ ارتباط مستوى التأثير بمستوى التركيز مع زمن التعرض فإطالة مدة التعرض قد تفوق تعوض النفق في التركيز ويمكن أن يحل إحداها محل الآخر لإظهار العلاقة الخطية $C:t=k$

٤-التعاطى بالفم (Oral administration) :

بعد الفم هو المجرى الأكثر توقعا للسموم المعدية ذات الطبيعة الثابتة أمام العصارة المعدية الحامضية و المعوية القلوية حيث تمتص جزئياته بكليهما كذلك ذات الطبيعة الغير مهيجة (Irritant) أو مقلصة (Convulsion) أو مقينة (Vomiting)

و تتم المعاملة مع الثدييات كالغزيران أو الأرانب بإدخال الجرعة المرغوبة

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 الأنبوب عن المحقن حيث يملأ المحقن بالهواء ثم يوصل بالإنبوب ويضغط المكبس لإخراج ما تبقى من الجرعة بالإنبوب

وبعد الإنتهاء من المعاملة يتم مسك الحيوان من أذنيه فترة للتأكد من سريان الجرعة وعدم رجوعها لذا يفضل تجويع الحيوان لمدة تسع ساعات بين 4-6 ساعة قبل المعاملة وهو ما يتيح أيضا عدم وجود كتل غذاء بالقناة الهضمية تعمل على تخفيض الجرعة بامتصاصها عليها .

وقد يخلط المركب المختبر مع البيئنة الغذائية (mixing with food) بالتركيز المطلوب وهذه الطريقة أقل دقة من السابقة لعدم إمكانية تقدير الكمية المأخوذة بالضبط كما يعييبها صعوبة تحضير وتجهز الوحدة المعاملة 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 السجائر 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 للبيئنة الغذائية

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

أما طريقة السقي و الإرتشاف حيث يسقى الكائن المختبر المركب في

صورة ذاتية أو مستحلية مع مياه الشرب أو تضاف للمحلول السكري بالنسبة المطلوبة للتغذية . وبتقدير حجم السائل قبل وبعد التغذية يتم تقدير حجم السائل المتناول و منه يتم حساب الكمية (حجم × تركيز)

أما طريقة الساندويتش (Sandwich Technique) حيث توضع جرعة المركب المختبر (حجم × تركيز) بين قرصتين من المادة الغذائية للكائن المختبر كقرصي عجينة البينة الغذائية أو قرصين من ورق النبات مثلا ثم يقدم للتغذية لفترة ما ثم يتم حساب للمساحة المتأولة والمغذى عليها وتطرح من المساحة الكلية للقرص قبل التأول فنحصل على الكمية المتأولة 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 عليه وهنا يفضل تدفئة المحلول ليكن أكثر جذبا كما أن الدرجة سمك الغشاء ولونه و ملمسه ورائحته عوامل جذب لنجاح الاختبار أو قد تستخدم خلية (Clip on Cage) ، 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 Cage) مثبتة على السطح

٥-التغفير 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 يتحرك فوقه وغالبا ما تستخدم مع السموم اللامسة (Contact poisons) حيث يتم حساب كمية المترسب / وحدة .
ومتميز هذه الطريقة بسهولة أجزائها لكنها أقل دقة من حيث النتائج المتحصل عليها و قد نرغم على إستعمالها في حالة المركبات المختبرة بصورة مسحوق وهنا يجب مراعاة التصاق حبيبات المسحوق بجسم الكائن أثناء حركة عليه .

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 عليه عند ما يكون تأثير المادة المختبرة لامس و معدي (Contact & Stomach poison) نتيجة التلامس المباشر بين الكائن و مترسيات 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 لتلاشى أثر التجمع للقطرات ما أمكن وعند تشغيل طلمبة الهواء يرتفع المسرح لأعلى ليقلل الفتحة السفلي للاسطوانة وعندما تبدأ فوهة الرش في العمل حتى يتم تدرير 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 إنقاس المركب والمؤثرة بدورها على نشاط الكائن المختبر .

وعند تعريض الكائنات الدقيقة النشطة فإنه يتم وضعها بحجرة سالك (قفص) بأبعاد ثلاثم 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 للميت عند الفحص يوميا .

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

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 بإستخلاصها ثم تقديرها كميًا 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 تدرن:

- 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) =
$$\frac{\text{عدد العينات لكل مرحلة} \times \text{القيمة العددية للمرحلة} \times 100}{\text{العدد الكلي للعينات}}$$

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 معاملة 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 - غسل 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 وبعثق ثابت تخلط جيدا لتكوين عينة مركبة (Composes) تجفف بالهواء ثم تقسم لعدة مكررات في أكواب بلاستيك (١٠٠ أجم) منقبة 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 النباتات بكل أصص لعدد ثابت ثم تربي 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 بعثق ١٠ سم = ١,٥ مليون رطل .

٢-٢- قياس حركة و غسل المركب بقطاع من التربة :

بعض المركبات قابلة للغسيل لزيادة معدل ذوبانها في الماء وقلة إدمصاصها بحبيبات التربة سواء بمياه الري أو المطر فتقل فاعليتها بالطبقة السطحية لتشربها وتحركها للإعماق .
ترداد قابلية المركب للغسيل بالأراضي الرملية < الخفيفة < الثقيلة < الطينية < الطينية المحتوية على مادة عضوية .

حيث تؤخذ كمية معلومة من التربة وتوضع في عمود زجاجي بطول ٣٠ سم وقطر ٢٤ سم ويملاً إلى ٤/٣ ارتفاعه بالتربة ويقفل من أسفل بغطاء وتخرج منه صنوبر أعلاه صوف زجاجي .

ثم يوضع تركيز من المركب المختبر (٠,١ جم) بسطح العمود وبعد إذابته بقليل من الماء يضاف إليه ٥٠٠ ملل ماء / خمس دفعات كل منها ١٠٠ ملل على فترات مع فتح الصنوبر السفلي لإستقبال الرشح الذي يحلل كيمائياً .

ينتزع غطاء الكاوتشوك وتستقبل التربة بنفس هيكلها وتقسم لثلاث طبقات يوضع كل منها بكوب للتقدير الحيوي و الكيمائي .

٣- التقييم الحيوي لمبيدات العناكب (Acaricide bioassay) :

حيث تستخدم العناكب من عائلة (Fam. Arachnidae) كأداة للتقييم الحيوي للسموم الموصى بها حيث يؤخذ ٥٠-١٠٠ عنكبوت / معاملة وترداد إلى ١٠٠ عند التقييم الحيوي بغرض المفاضلة والتصفية (Screening) بين عدة سموم لاختيار أكواها و أفضلها .

ويتم الفحص والعد بطريق :

- الطبع (توضع الورقة النباتية التي عليها العناكب المحتوية بين قرصين الورق الأبيض ثم الضغط عليها بإستواء فيترك كل فرد بصمة مكانه بالورقة البيضاء)
- أو تعامل الورقة بأبخرة الإيثيلين داى كلوريد ثم تجمع الأفراد الميتة بسهولة بفرشاة وتجميع وتعد
- أو يتم شطفها بشطف الهواء حاملة إياها لقارورة صغيرة ثم تعد ويمكن أثناء العد تميز الأطوار المختلفة لبيان أثر المركب على كل 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

٤-١-١-١- من حيث التأثير على إنبات الجراثيم (Spore Germination) :
حيث تطرأ عدة تحويرات تطويرية على هذه الطريقة لتناسب وتلائم
نوعيه جراثيم الفطر وظروف التجربة .

٤-١-١-١-١- 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 المحتوي على الجراثيم مع محلول المركب المختبر
مع المادة المغذية بأنبوب اختبار وترج جيدا ثم تؤخذ منها نقطة أو أكثر
وتفرد وتحضن في أطباق بتري ثم تقدر النسبة للإنبات وتفضل هذه الطريقة
مع الفطريات التالية :

Monilinia frocticola

Alternaria solani

Glomirella cingulata

Stephnhelium 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 وهي على ورق ترشيح أو شريحة زجاجية لجرعات مختلفة من الغاز السام وتتوقف مقدرة النشاط الإيادي للغاز السام على قدرته على إختراق وتخلل الجرثومة حيث تقدر بعد ذلك النسبة المئوية لإنباتها أو يستخدم معلق الجراثيم في بيئتها الغذائية لإثباته ثم يمرر فيه الغاز السام وهنا تتوقف قدرته على الذوبان بالمعلق .

٤-١-١-٣- إنبات الجراثيم على طبق أجار (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 الإيادي 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 السكر فإنها تنتفخ ويصبح حجمها خمسة أضعاف على مدى ثلاث ساعات / ٣٠م وتستخدم هذه الظاهرة في تقيم النشاط الإيادي 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 الأجار السائلة

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

وهنا يتخذ النمو الهيفي كقياس لتقدير النشاط الإبدي عند تقدير الزمن اللازم ليصل الفطر لقطر محدد (لوجود علاقة خطية بين النمو الإشعاعي للفطر والزمن) .

وهنا تقاس السمية النسبية للفطر (Relative Fungitoxicity) بأنها أقل تركيز من المركب لا يحدث عنده نمو هيفي للفطر وتكون :

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{قطر النمو بالكونتروال (A) - مثيله بالمعامل (B)}}{\text{قطر النمو بالكونتروال (A)} \times 100}$$

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

حيث يوضع الأجار السائل مع تركيزات مختلفة من المركب السام المختبر وجراثيم أو هيفات الفطر في زجاجات صغيرة وتلف بسرعة حول محورها فيتجمد الأجار على جوانب جدرانها.

وهنا يتخذ النمو الهيفي كقياس لتقدير النشاط الإبدي عند تقدير الزمن اللازم وتقاس السمية النسبية للفطر (Relative Fungitoxicity) بأنها أقل تركيز من المركب لا يحدث عنده نمو هيفي للفطر

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

وتستخدم مع الفطريات المتكاثرة بالجراثيم أو الهيفات ولكن يعيها احتياجها لفترة طويلة حيث تؤخذ النتائج بطريقة +،- كل ٢٤ ساعة ولمدة ١٠-٧ يوم .

كذلك تحتاج لخبرة لمعرفة سرعة النمو وقطر المستعمرة خاصة وأن النمو يكون موجود بقلّة مع أن التركيز المستخدم يكون قليل جداً ولهذا لا تنجح إلا مع الفطريات المرباه على بيئات صناعية وتحضر بأخذ ٢٠٠ جم بطاطس يضاف إليها ٥٠٠ ملل ماء ثم ١٥ جم سكر دكستروز وتطبخ

المحتويات لمدة ٣٠ دقيقة ثم تبرد ويضاف إليها ١٠ جم أجار 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 بالآجار (PAD) ثم يغطى بمعلق الجراثيم أو الهيفات بمركز كل قرص وتسجل النتائج بقياس منطقة عديم النمو (التثبيط) حول قرص الورق فيدل على فاعلية المركب والمتوقعة على مدى تأثير المركب ومعدل نوبانه وانتشار بالآجار .

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 .

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

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

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

يتم التقييم الحيوي لممانعات التغذية من خلال اختبارات معملية تحت ظروف قياسية بهدف دراسة التأثير البيولوجي 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 الابتعاد عن العائل المفضل المعامل .

كذلك تتم ملاحظة الاستجابة للقمض (Biting response) وعددها وشدها
(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 المورفولوجي لكل طور .

وتختلف طريقة المعاملة بماتعات التغذية باختلاف :

- نوع أجزاء الفم بالكائن المختبر فالكائنات القارضة يفضل معاملة عائلها المفضل أو معاملة الغذاء الجاف الخاص بها كالذئبق 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 إختياري 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 أجزاءه 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 حيويًا . كما تغمر أقراص أخرى مماثلة في المذيب فقط ككونترول ثم تجفف الأوراق بتركها لفترة في الهواء العليلي (لا يفضل استخدام تيار هوائي من مروحة مثلا حتى لا يؤدي لخفض في تركيز المركب بعد جفافه بهيئته قشور) .

تقدم الأقراص للتغذية وبفضل تجويع الطور المتعدى لمدة لا تقل عن ٧ ساعة .

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

معدل التغذية (Feedant rate . FR) =

$$\frac{\text{مساحة القرص} - \text{مساحة الجزء المتبقي بالمعامل } 100 \times}{\text{مساحة القرص} - \text{مساحة الجزء المتبقي بالكونترول}}$$

معدل منع التغذية Amifeedant Rate = 100 - % معدل التغذية (FR)

معدل استهلاك التغذية = معدل التغذية / عدد الكائنات بالقرص الواحد

و كمثل لذلك ففي تجربة لتقييم مانع تغذية بطريقة القرص كانت متوسط مساحة القرص النموذجي هو ٨,٨٥ سم^٢ ووضع ١٠ كائنات مختبرة معا على كل قرص وبعد ٧ ساعات أخذت الأقرص وتم حساب متوسط التغذية فكلنت كما يلي :

مِساحة قرص الورق	التركيز
٢-١٠ سم	بدون معاملة
٢ سم ٢,١١	٣,١٥
٢ سم ٣,٥٠	٦,٢٥
٢ سم ٤,٤٧	١٢,٥٠
٢ سم ٥,٥٨	٢٥,٠٠
٢ سم ٦,٨٠	٥٠,٠٠
١ سم ٧,٩٠	١٠٠

ولحساب معدل التغذية (FR) ومعدل مانع التغذية (AFR) ومعدل
إستهلاك الكائن (معدل التغذية FR - مساحة القرص - مساحة المتبقي ÷
مساحة المتبقي بالمقارنة × ١٠٠) كما بالجدول التالي :

معدل استهلاك الكائن /	معدل منع التغذية AFR	معدل التغذية Feeding rate	مساحة القرص سم ٢	التركيز PPm
-	-	$100 \times \frac{2.1 - 8.85}{2.1 - 8.85}$	٢,١٠	٠,٠٠
% ٩,٩٨	% ٠,٢٠	% ٩٩,٨	٢,١١	٣,٣٥
% ٧,٩	% ٢١,٠	% ٩٧,٠٠	٣,٥٠	٦,٢٥٠
% ٦,٤٨	% ٣٥,٢	% ٦٤,٠٠	٤,٤٧	١٢,٥٠
% ٥,٢٨	% ٤٧,٢	% ٥٢,٨٠	٥,٢٨	٢٥,٠٠
% ٢,٠	% ٧٠,٠	% ٣٠,٠٠	٦,٢٨	٥٠,٠٠
% ١,٤	% ٨٦,٠	% ١٤,٠٠	٧,٩٠	١٠٠,٠٠

٢- طريقة وزن الكائن المختبر قبل وبعد التغذية :

نختار أفضل العوائل للكائن المستهدف المفضل له في التغذية ثم نختار
أفضل أوراق النبات الغضة الخضراء .
ويتم عمل أقراص من حواف هذه الأوراق بعيدا عن منطقة العروق
لكثرة محتواها العصيري
وتغمر هذه الأقراص لفترة محددة في محاليل التركيزات المختلفة للمادة

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 تتفشر متبقيات المركب وتتطاير ويحدث فقد بالتركيز و يتم تجويب الطور المتغذي من الكائن المختبر لمدة لا تقل عن ٧ ساعات ثم يوزن وبدئة 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 : تغذي بالأقراص المعاملة والغير معاملة . ثم تحسب :

- % للتجويع (Starvation) -

$$\frac{\text{الفرق في الوزن قبل وبعد الكونترول} - \text{الفرق في الوزن قبل وبعد المعامل} \times 100}{\text{الفرق في الوزن قبل وبعد الكونترول} - \text{الفرق في الوزن قبل وبعد بالصائم}}$$
- % لمعدل المنع أو الحماية (Protection) -

$$100 \times \frac{\text{مساحة الورق قبل المعاملة} - \text{مساحة الجزء المستهلك بعد المعاملة}}{\text{مساحة الورق قبل المعاملة}}$$
- معدل الاستهلاك Consumption -

$$100 \times \frac{\text{مساحة الجزء المستهلك} - \text{مساحة الورق قبل المعاملة}}{100}$$

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	٣٤,٧٨	٢٧,٩٠ %
٢٠٠,٠٠	٣٠,٤٩	٣٣,٨٠ %

- % للتجويع -

$$\frac{\text{الفرق في الوزن قبل وبعد المقارنة} - \text{الفرق في الوزن قبل وبعد بالمعامل} \times 100}{\text{الفرق في الوزن قبل وبعد المقارنة} - \text{الفرق في الوزن قبل وبعد في الصائم}}$$

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 تتوعد طرق المعاملة :

٦-١- طريقة التغذية (Feeding Method) :

حيث تحضر التركيزات المختلفة من المعقم المختبر المراد تقييمه حيويًا ثم توضع كل نكر و أنثى من الكائن البالغ المختبر ببرطمان زجاجي مغطى فوهته بسلك أو بشاش ثم تجهز مادة التغذية لتعطي أعلى كفاءة تناسلية ثم يضاف إليها التركيز من المعقم موضع الاختبار تترك ٢٤ ساعة حيث يتم استبداله وتغييره بأخر لا يحتوى على المعقم لوضع البيض وتترك في الظلام لتتبيه عملية التلقيح .

$$\% \text{ الفقس (Hatchability) } = \frac{\text{عدد البيض الفاقس}}{\text{عدد البيض الموضوع}} \times 100$$

$$\% \text{ للعقم (معدل العقم) (Sterility rate) } = 100 - \% \text{ الفقس} =$$

$$100 \times \frac{\% \text{ للعقم بالمعامل} - \% \text{ بالمقارنة}}{100} =$$

$$100 - \% \text{ بالمقاومة}$$

$$\% \text{ للعقم المصححة} = \frac{\% \text{ للعقم بالتركيز الثاني} - \% \text{ للعقم بالتركيز الأول}}{100} \times 100$$

$$\% \text{ للكفاءة التناسلية (Fecundity) } = \frac{\text{عدد البيض الفاقس بالمعامله}}{\text{عدد البيض الموضوع بالمقارنة}} \times 100$$

$$100 \times \frac{\text{عدد البيض الموضوع بالمقارنة} - \text{عدد البيض الفاقس بالمعامل}}{\text{عدد البيض الموضوع بالمقارنة}}$$

$$\% \text{ الفقس في الكفاءة التناسلية} = 100 - \% \text{ الكفاءة التناسلية}$$

$$= \text{الانكدار التناسلي (Reproductive Potential) } =$$

$$100 \times \frac{\text{عدد البيض الفاقس بالمعامل} - \text{عدد البيض الموضوع بالمعامل}}{\text{عدد البيض الفاقس بالمقارنة} - \text{عدد البيض الموضوع بالمقارنة}}$$

حد الأمان (Safety level SF1) : LD₅₀ / LD₅₀
فإذا كان الناتج يساوي 5 أو أكبر من 5 تقبل المادة كمعقم .
و يلاحظ أن :

- LD₅₀ : تستنتج من عمل خط سمية للمادة المختبرة كمعقم .
SD₅₀ : 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 (اجم بكتين + 5جم سكر + كمية من الماء تكفي للعجن) و توزع الأقراص في برطمانات بكل منها تكو ٥ أقراص و هكذا كما سبق ترفع الأقراص بعد يوم و يوضع محلها بديل غير معقم لمدة ساعة ثم تعاود الأقراص مرة أخرى ويتم حساب أثر المعقم على :

- = النسبة المئوية للفقس
= النسبة المئوية المصححة للعقم
= النسبة المئوية للكفاءة التناسلية
= النسبة المئوية للنقص في الكفاءة التناسلية
= النسبة المئوية للإقذار التناسلي
حد الأمان (SF1)

٦-٣- طريقة المتبقيات (Residue technique) :

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

- = النسبة المئوية للفقس
= النسبة المئوية المصححة للعقم

التقييم الحيوي لتقدير الجرعة القاتلة للنصف :

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

- نسبة الإستجابة الصغري أو الدنيا و الناجمة عن إستخدام أقل تركيز أو جرعة (Minimal Lethal Dose 00.00) أي الجرعة أو التركيز الذي يعطي معدل إستجابة أو موت يساوي صفر .
- نسبة الإستجابة القصوي أو العليا و الناجمة عن إستخدام أعلى تركيز أو جرعة (Maximal Lethal Dose 100.00) أي الجرعة أو التركيز الذي يعطي معدل إستجابة أو موت يساوي ١٠٠% و أي زيادة في قيمة التركيز لا تؤدي إلي زيادة في النسبة المئوية للموت .
- تقدير معدلات الإستجابة لعدة جرعات وسطية بين هاتين الجرعتين و بفروق متساوية لو غارتميا . حيث يتم تقدير الجرعة تبعا لوزن الكائن الحي المعامل و هنا يتم عمل محلول قياسي للمركب المختبر و ذلك بأخذ وزنة بدقة ثم إذابتها في مذيب مناسب و الذي يجب إختبار سميته أيضا و تقدير نسبة الإستجابة لكمية المذيب المستخدم و الداخلة في تجهيز التركيز المستخدم لطرحتها من نسبة الإستجابة الكلية و بالتالي يتسني ملاحظة تأثير المذيب إن وجد له تأثير . يتم بعد ذلك عمل عدة تخفيفات (Dilutions) من المحلول القياسي السابق لإستخدامها في المعاملة .

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

الجرعة (مليجرام / كجم) X وزن الكائن الحي / ١٠٠٠ = مليجرام / كجم
ثم يحدد الحجم الموجود فيه هذه الكمية من المركب السام في محلول ٥% علي سبيل المثال :

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

$$= \text{مليجرام/كجم} \times 100 / 1000 \times 5 \text{ مليجرام /حيوان / جم}$$

وفي حالة المركبات السامة المختبرة الغير نقية تراعى نسبة النقاوة وعمل:
تصبح للتركيز المستخدم = الوزنة الماخوذة $\times 100 / \%$ للنقاوة
فعلى سبيل المثال يراد حقن فأر وزنه ٣٠ جم بمركب المالاثيون

٥٠% وبجرعة مقدارها ١٠ ملليجرام / كج
الجرعة المطلوبة ١٠ مللج من المركب / ١٠٠٠ جم من وزن الكائن
كمية المركب اللازمة لحقن فأر ٣٠ جم =

$$= 1000 / 100 \times 30 \text{ مللج / فأر وزنه ٣٠ جم}$$

وبما أن تركيز المركب ٥٠% :

$$\text{الحجم الموجود فيه ٠,٣ مللج} = 100 \times 0,3 / 1000 \times 5 = 0,0006 \text{ مل}$$

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

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

$$= \% \text{ للموت في المعامل} - \% \text{ للموت بالكونترول} \times 100 / 100$$
$$= 100 - \% \text{ للموت الكونترول}$$

٦. تقدر الجرعة المميتة الوسطية القاتلة للنصف :

$$M = k \times (\text{الجرعة القاتلة } 100\%) + b \text{ لو } d \text{ (ثابت الفترات) } - c / r \text{ (العدد الكلي للموت) } \cdot d$$

يقدر قيمة الوفاة التي تسمى للجرعة القاتلة للنصف (Vm) - $(n-1) r$ مع $(n-1) / d^2$ -

يقدر الخطأ القياسي (Standard error) على مستوى $SE_{m,0.05} = Vm^{1/2}$ $\therefore SE_{\pm m}$ (0.05)

تقدر حدود الثقة العليا والدنيا (Confidence limits) والمتوقع أن تقع قيمة

الجرعة القاتلة للنصف بينها ودرجة احتمال 90% ، 99%

لو 90% $F = 2.77 / N$ (عدد الكائنات المختبرة بين LD_{84} - LD_{16}) لو S

لو 99% $F = 3.641 / N$ (عدد الكائنات المختبرة بين LD_{84} - LD_{16}) لو S

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

و يتم تصحيح نسب الموت المبدئية المتحصل عليها من تجارب التقييم الحيوي مباشرة و التي لا تصلح للتحليل الإحصائي إلا بعد تصحيحها مقارنة بنسب الموت الطبيعي الموجودة في الكونترول بإحدى المعاملات التالية تبعاً لنوع التجربة :

النسبة المئوية المعطلة للموت بمعاملة ابوت =

$$\% \text{ للموت المعامل} - \% \text{ للموت بالكونترول} \div 100 - \% \text{ للموت بالكونترول} \times 100$$

النسبة المئوية (Handerson & Tilton) =

$$100 \times \left[\frac{1 - (\text{العدد بعد المعاملة})}{(\text{العدد قبل المعاملة})} - \frac{(\text{العدد بالكونترول قبل المعاملة})}{(\text{العدد بالكونترول بعد المعاملة})} \right]$$

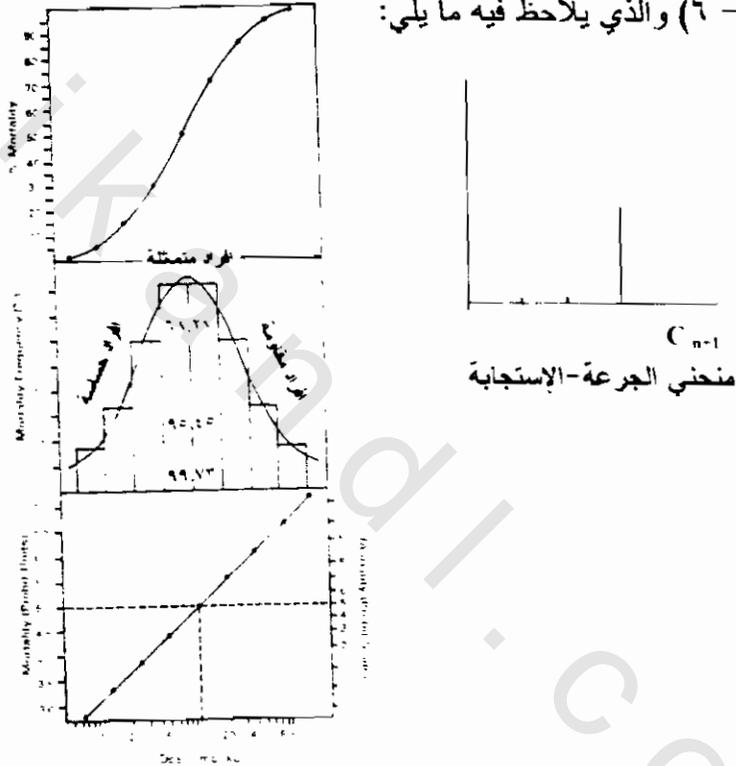
النسبة المئوية (Sun & Shephard) =

$$100 \times \frac{(\% \text{ للموت بالمعامل} + \% \text{ للتغير في الكثافة العددية قبل وبعد المعاملة})}{100 + \text{التغير في الكثافة العددية قبل وبعد المعاملة}}$$

والمعاملة الأخيرة تكاثر مع الكائنات سريعة التكاثر والتي يتضاعف عددها عدة أضعاف في يومين أو ثلاثة

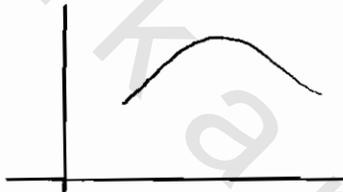
عرض نتائج التقييم الحيوي

عند عرض النتائج الخاصة بمجموع أفراده متماثلة في صورة علاقة بين درجة الاستجابة (% للموت) وتركيزات منخفضة فإنها لا تعطي نسب موت مقابلة لها ولكن عند تعرضها لأول تركيز مرتفع (C_{n-1}) يقتل جميع الأفراد ويتمثلها بيانياً نحصل على خط رأسي على بعد معين من المحور السيني . وعند عرض النتائج لأفراد مجموع غير متماثل كما بالطبيعة في صورة علاقة بين درجة الاستجابة (الفرق في النسبة المئوية للموت بين كل تركيزين متتاليين نحصل على منحنى تكراري معتدل (Normal Frequency curve) شكل رقم (٦-٣) والذي يلاحظ فيه ما يلي:



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

١. للمنحنى نهاية عظمى بالمنتصف ثم تقارب على جانبي هذه النهاية متساوي ومتماثل لتماثل غالبية الأفراد في درجة استجابتها .
٢. نجد أن ٦٨,٢٧% من عدد الأفراد تنحصر استجابتها بين التركيزين C_1 و C_2 أي وحدة إنحراف معياري واحدة أي $1 SD \pm M$
٣. بزيادة عدد التركيزات يصبح المنحنى أكثر تفرطاً لانخفاض نسبة الموت بين كل تركيزين متتاليين فنجد أن :
 - ٢ ٩٥,٤٥% من عدد الأفراد تنحصر بين القيمتين $2 SD \pm M$
 - ٣ ٩٩,٧٣% من عدد الأفراد تنحصر بين القيمتين $3 SD \pm M$
 أي أن كل وحدة إنحراف معياري تمثل نسبة أفراد تردداد حول الوسط ونقل بالاتجاهين فيتحول لخط مستقيم ويأخذ الأشكال التالية ، شكل رقم (٧-٣)



منحنى تكراري مفلطح

Platy curties F. curve

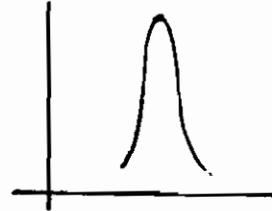
- منحنى متماثل أكثر تفرطاً
- يحتوى على نسبة كبيرة من الأفراد متجانسة الاستجابة في مدى واسع من التركيزات



منحنى تكراري ذو قمتين

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

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



منحنى تكراري مدبب

Leptocurties F. curve

- منحنى تكراري متماثل أكثر تكبب
- يحتوى على نسبة قليلة من الأفراد المتجانسة في مدى ضيق من التركيزات

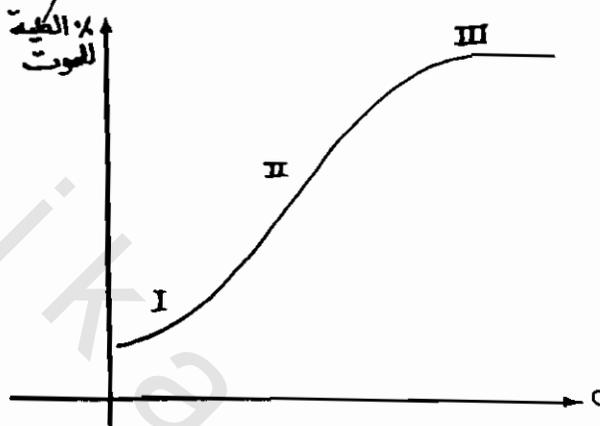


منحنى تكراري سالب(-) أو موجب(+)

Skwnesis F. curul

منحنى تكراري ذي له لليسار يحتوى على نسبة كبيرة من الأفراد متجانسة الاستجابة بالجانب الأيسر (تركيزات منخفضة)

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 (Cumulative Ferquensy curve) يمر بثلاث مراحل بالشكل رقم (٣-٨):



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

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

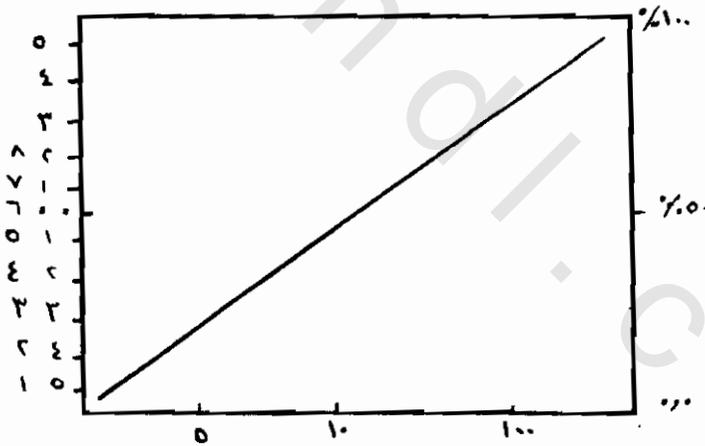
المرحلة الثانية: تتوسط المنحنى وتمثل الأفراد و الأكثر تحملا وتمثل معظم الأفراد المتماثلة نتيجة الثبات النسبي في درجة استجابتها حتى مع التغير في التركيز القاتل حيث أن الزيادة في التركيز يقابلها زيادة في نسبة الموت .

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 المنحني وذلك لعدم خطيته
- ج- % للموت لتركيزات لم تستعمل بالتجربة خارج نطاق التركيزات المستخدمة كذلك % صفر للموت أو ١٠٠%
- د- مقارنة منحني سلالة بمنحني سلالة أخرى لنفس التركيزات أو العكس
- لذا قام Gaddum بتحويل هذا المنحني السيجمويدي الغير متمائل لخط مستقيم حيث تتناسب درجة الاستجابة (% للموت) طردياً مع لوغاريتم التركيز وليس تبعاً للتركيز كما يقانون Weber fechner فينتج منحني أكثر تماثلاً لتضاعف قيم التركيزات (لو ١٠ = ١ ، ١٠٠ = ٢)
- ثم قام العالم Bliss بتعديل قيم وحدات الإتحراف المعياري وحولها لوحدة بروبيت (Probability unites : Probits) بإضافة رقم ثابت (٥) لوحدة الإتحراف المعياري ورسم العلاقة على ورق لو بروبيت ووقع الاستجابة على مقياس البروبيت للتركيزات بصورة لوغاريتمية فأعطت خط إنحدار مستقيم وسمى بمنحني لوغاريتم الجرعة - الاحتمال (Log dosage probit line : line ، شكل رقم (٣-٩) وقام بعمل الجدول رقم (٣-٢) :



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

جدول رقم (٣-٢) : تحويل النسب المئوية للإبادة إلى 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	٧,٢٣

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 بعده من زيادة التركيز
فتزداد سمك طبقة المترسبات دون زيادة الكمية المتلقطة 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 لقطة الخبرة أو لقطة عدد التركيزات المختبرة أو لبعدها كثيرا علي أن يمر خط يتوسطها يلجا إلى طريقة المربعات الصغرى .

ب- طريقة المربعات الصغرى : Least squares method

وتعتمد هذه الطريقة علي ايجاد قيمة انحراف كل نقطة عن خط الاتحدار من خلال تقدير قيم x ، 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 y تعتمد علي التركيز x حيث f دالة التركيز (x) أي أن $y = f(x)$

فعند اجراء التقييم الحيوى لمستخلص البتروليم ايثير لحبوب نبات الحلبه علي حشرة *Sitophylus Oryzae* مضاف إلى بيئتها الغذائية وبتراكيزات ٢٠، ٤٠، ٨٠، ١٠٠، ١٦٠، ٢٠٠، ٣٠٠، ٤٠٠ كانت نسبة الاستجابة المقابلة لها ١٠ و ١٣ و ٢١ و ٥٦ و ٨١ % ويراد توقيع الخط بطريقة المربعات الصغرى و إيجاد قيمتي الجرعة القاتلة للنصف والميل .

الجرعة x	الموت %	الموت % المصحح	χ^2	$\chi \cdot y$	$E\chi \cdot Ey$
٢٠	١٠	٣,٧٢	٠,٩٠٦	١,١١٩٧	
٤٠	٣١	٣,٨٧	٠,٣٦٢٤	٢,٣٢٩٧	
٨٠	٥٦	٤,١٩	٠,٨١٥٤	٣,٧٨٣٩	١٠٢,٩٨٧١
١٦٠	٨١	٥,١٥	١,٤٤٩٦	٦,٢٠١٢	٥
٣٠٠	١٠٠	٥,٨٨	٢,٢٦٥٠	٨,٨٥٠٣	
		٢٢,٨١	٤,٩٨٣	٢٢,٢٨٤٨	٢٠,٥٩٧

$$\text{الميل} = \frac{n(Ey) - E\chi \cdot Ey}{n(E\chi^2) - E\chi^2} = \frac{100(22.2848) - 22.2848 \cdot 20.597}{100(1.983) - 22.2848^2} = \frac{2228.48 - 458.1}{198.3 - 496.7} = \frac{1770.38}{-298.4} = -5.93$$

$$1.8629 = 0.906 / 1.6878$$

$$y_1 = b + a(x_1 - \bar{x}) = 3.44 - (0.906 - 0.301)1.8629 + 0.067 = 3.11$$

$$y_2 = b + a(x_2 - \bar{x}) = 4.00 - (0.906 - 0.301)1.8629 + 0.067 = 3.61$$

$$\begin{aligned} 23.0 & \quad 4.56 = (0.903 - 0.903)1.8129 + 4.562 = (x' - x_3) b + y' = y_3 \\ 55.0 & \quad 5.12 = (0.903 - 1.204)1.8129 + 4.562 = (x' - x_4) b + y' = y_4 \\ 57.0 & \quad 5.68 = (0.903 - 1.505)1.8129 + 4.562 = (x' - x_5) b + y' = y_5 \end{aligned}$$

وبتوقيع قيم y الجدولية الجديدة في مقابل لو الجرعة يسهل رسم خط

مستقيم منه يستنتج

$$\begin{aligned} 7,00 = LC_{90} & \quad 1,40 = LC_{90} & 0,71 = LC_{30} \\ & \text{مع } (x-x)^2 & \text{مع } (x-x)^2 & \text{مع } (x-x)^2 \end{aligned}$$

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

ويلاحظ بالطريقة السابقة أن النسبة المئوية للموت بالقرب من النسبة 50% متقاربة ومتكدة و الخطأ في هذه المنطقة لن يغير وضع الخط بينما نجد العكس مع النسبة المئوية للموت المنخفضة الأقل من 50% أو الأكثر من 50% حيث يتباعد القيم عن بعضها و أي خطأ بسيط يؤثر على وضع الخط وهنا فمعاملة جميع النقط بالتساوي يؤدي لأخطاء في توقيع الخط لذا لابد من 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 (1 - 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 $Kp + y_0 = y$

حيث p نسبة الموت المصححة ، k ، y_0 فمن الجدول المقابلة للقيمة y

ب- إيجاد معامل الترجيح (Weighting coeff : k) لكل نقطة من الجدول

وبضرب عدد الكائنات x التركيز ينتج الترجيح (w)

ج- بحسب لكل خط قيمة x, y, w, o وتسجل بالجدول ثم تجمع قيم $(Ew)w, (Ewx)wx, (Ewy)wy$ ثم توجد المتوسطات $(Ew)w = Y$ و $(Ew)w = X$ وكذلك $(Ew + Exy) = Y$ و $(Ew + Exy) = X$

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

هـ- بحسب الميل $b = \frac{x'Ewy - Ewx^2}{x'Ewy - Ewyx}$

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

ز- لتقدير مدى دقة قيمة LD_{50} بحسب :

الاختلاف عن المتوسط (Variance : V) = $\frac{(Ewx^2 - Ewx^2)/(m-x)^2 + Ew}{1}$

تقدير قيمة X^2 لبيان مدى تماس النتائج = $(y'Eyx Ewy) - (x'Ewy - Ewx^2) b$

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

زادت عن مستوي احتمال 5% تعتبر الاختلافات مؤكدة و يعاد الحسابات

قلت عن مستوي احتمال 5% تعتبر الاختلافات غير معنوية

ح- بحسب قيم حدود الثقة على مستوي 95%

$$V^{1/2} \cdot 0.975 - m = m1$$

$$V^{1/2} \cdot 0.975 + m = m2$$

مثال :

WXY	WY	WX	W	k	y	Y	p	عدد n	% الموت	X لو	الترتيب X
71.87	87.47	10.28	71.0	27.0	1.09	7.8	1.00	0.0	8	-	0.0
1.00	118.9	28.10	27.7	7.0	1.71	1.7	1.79	17	2.0	87.0	0.70
217.2	217.2	07.7	07.7	731	0.08	0.7	0.08	83	07	1.00	7.0
07.08	1.70	21.807	7.8	277	7.71	7.7	7.71	0.0	92	1.70	7.0
07.98	28.08	7.78	0.7	0.131	7.12	7.0	8.09	1.0	1.00	1.177	7.0
	121.7	122.7			20.7					1.902	

$$1,181 = \sum x^2 Ewy - Ewx^2 / \sum x^2 Ewy - Ewxy = \text{الميل}$$

$$0.91 + 1,181 = (x^2 - x) b + y^2 = bx + (bx^2 - y^2) = y$$

التباين عن المتوسط (V) $1/b = \frac{[\sum W / (\sum WX)^2 - \sum WX^2 / (\sum X^2 - m^2)] + 1/W}{\sum W}$

$$122.77 / [(121.710 - 121.010) / (98.07 - 97.80) + 122.77 / 1] = 1,181 / 1 = 0.000862 =$$

عدي تجانس التباين $(\sum Wxy - \sum Wx)(\sum Wx - \sum Wx^2) =$

$$3,028 = 719,190 \times 0.000862 - 2117130 =$$

حدود الثقة $\sqrt{1 - 0.000862} \times 1.96 - m = \sqrt{1 - 0.000862} \times 1.96 - m = m_1$

$$0.0210 \times 1.96 - m =$$

$\sqrt{1 - 0.000862} \times 1.96 + m = \sqrt{1 - 0.000862} \times 1.96 + m = m_2$

$$0.0210 \times 1.96 + m =$$

خصائص خط لو غاريتم 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 موقعها 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 لكفا 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 تبعاً لكفاءتها الإبادية تنازلياً .

▪ 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
فإذا كانت القيمة الناتجة تساوي ٢٥+٢٥ يكون الفعل إضافة

سالم ١٩٩٠

معامل السمية المشتركة (Co-toxicity Coefficient) =

$\frac{\text{السمية الفعلية للمركب (أ) بالمخلوط} \times 100}{\text{السمية النظرية للمركب (أ) بالمخلوط}}$

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

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_{50} / LD_{90} .
ويزداد ميل الخط (الاتحداً) 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 . إذا توازى خطى 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 منحنى سيجمويدي و يحول إلي خط مستقيم باستخدام لوغاريتم الزمن و منه يقدر قيمة الزمن

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

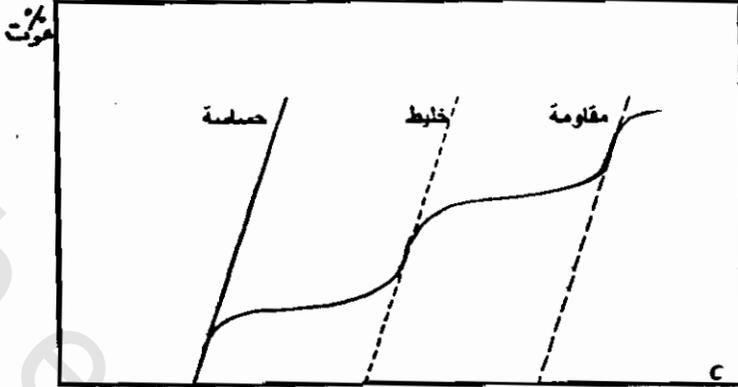
• تزداد قيمة الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) في حالة انعكاس المقاومة (Resistant reversion) وهنا يتحرك الخط لليسار و تتدرجيا :

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 فاتق
فإذا كانت درجة مقاومة الجيل الرابع F4 = LD_{50} لها ÷ LD_{50} للحساسة = ٦,٥ = ذات تحمل فاتق 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 وتمائل 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 وتنقص الأفراد الحساسة تدريجيا .

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

٧. عند 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) .

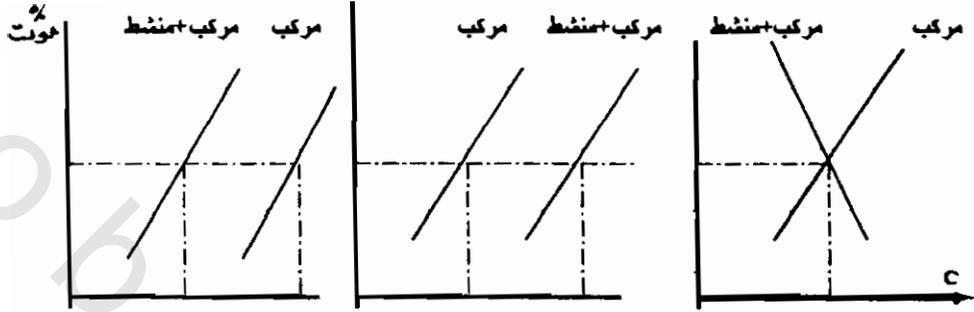


شكل رقم (٣-١٠) : سيادة غير تامة (Partial dominance) لوجود أفراد خليط

وتكون النسبة المئوية لدرجة التنشيط (Synergistic rate) = معامل السمية المشتركة =
 الجرعة القاتلة للنصف للمركب (LD₅₀) / الجرعة القاتلة للنصف للمركب (LD₅₀) + المنشط

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

- و هنا تقيم المواد المنشطة بمعياران هاما وهما :
- قيمة الجرعة القاتلة للنصف (LD₅₀) 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



* إنخفضت قيمة الجرعة القاتلة للنصف للمركب + المنشط لزيادة معدل النفاذية أو تحلل المركب أو لتثبيت الهادم للمركب .

* للمنشط تأثير تضادي فأرتفعت قيمة الجرعة القاتلة للنصف للمركب + المنشط

* تتساوي الجرعة القاتلة للنصف للمركب والمنشط

* ميل الخطين واحد لتماثل طريقة الفعل .

* ميل الخطين واحد (متوازن) لتماثل طريقة الفعل .

* ميل الخطين مختلف لإختلاف 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 فنقل 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 موثمة الجين كلها عوامل تؤثر بدورها على قيمة الجرعة القاتلة للنصف والميل .

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

كذلك فالأطوار الخاملة كالبيض والعدارى فهي أكثر تحملا عن الأطوار النشطة كاليرقات والطور الكامل حيث تختلف مدى تحمل الطور الكامل يتقدم العمر وهو ما يرجع للاختلافات الفسيولوجية والنشيرية وما يرتبط بها من تفاوت في الحجم والتركيب والمكونات الحيوية الداخلية لكل طور والنشاط الإتريمي (أي التغيرات الفسيولوجية و البيوكيميائية المختلفة) ولكن عند حساب الجرعة (التركيز) على أساس الوزن نجد أن التطور في الأطوار أو تقدم العمر نجد الاستجابة ثانياة 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 الاعتبار أن الإستجابة بجانب إرتباطها بوزن الكائن قد ترتبط أيضا بمساحة المسطح الداخلي أو الخارجي المعرض لذا نجد أن :

$$LD_{50} (LC_{50}) \times \text{مساحة الجسم} \div \text{وزن الجسم} = \text{ثابت} \times \text{وزن الجسم}^{2/3}$$

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 : باختلاف دورة حياة الكائن وطريقة تكاثره وهجرته وحركته وطريقة تغذيته وكميتها ونوعها والانسلاخ عوامل تؤدي 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 بتمائل 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 باتباع طرق المعاملة (التعريض) الشديدة التأثير كالحقن و العكس بالمعاملة القمية (السطحية) حتى أن الاستجابة الظاهرة عقب الحقن مباشرة تكون أكثر تماثلا وشدة الميل أكثر انحدارا

٢-٣- نوع المذيب : قد تؤدي استخدام المذيب كأداة (Vechiel) للمساعدة في إجراء 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 مذيبي الأسيٲون مثلاً يرفع سمية التركيزات المنخفضة المعاملة قميًا بينما يخفض من تأثير الجرعات المرتفعة لترسيبها فلا تمتص إلا نسبة قليلة منها مما يؤدي في النهاية إلى رفع الجرعة القاتلة للنصف وينخفض بالتالي الميل .

واستخدام المذيبات و التي تغير من طبيعة طبقة الليبيد عن وضعها الموازيكى مثل مذيبي داي ميثيل سلفوكسيد (DMSO) فتوقف المقدرة الاختيارية لنفاذ جزيئات المركب فترداد النفاذية خلال طبقة الأدمة (الجلد) حيث تزيل بعض الأجزاء الليبيدية فتعمل ثقوب طبقة القرنية وتحل جزيئات المذيب محل جزيئات ماء الجلد فتغير وينمط عكسي من تركيب بروتيين القرنية .

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

أما فترة ما بعد التعريض فترداد 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 تبعًا لنوع الكائن والمركب المختبر .

٣- عوامل متعلقة بالبيئة الخارجية (Extrinsic factors):

٣-١- درجة الحرارة : تؤثر درجة الحرارة المربي 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 دنت-ديهيدروكلورونيز و الإنزيمات ذات الوظيفة المختلطة (Mixed Function Oxidase : MFO) فالإنزيم الأول له معامل حواري سالب (Negative temperature coefficient) فيكون أقل نشاطا على درجات الحرارة المنخفضة و بالتالي يكون مركب دنت أكثر سمية على درجات الحرارة المنخفضة للكائنات المعاملة بها والعكس في حالة ارتفاع درجة الحرارة قد تؤدي لتنشيط الإنزيم الهادم لجزيئات المركب وقد يكون العكس مع الديلدين و الالدين 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 الدنت.

٣-١-٥- تؤدي 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 يؤدي لزيادة المحتوى الدهني الغير مشبع و يستدل على ذلك من خلال تقدير الرقم اليودي و الذي يبلغ ٧٢ بالصرصار الأمريكي وينخفض إلى ٦٠ بترتيبه على درجات حرارة أعلى من ٣٢م 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 المرباه على درجة حرارة منخفضة لانخفاض معدل النفاذية والامتصاص والانتشار و بالتالي انخفاض سرعة أعراض التسمم فأغلب المركبات السامة أكثر سمية على درجات الحرارة المنخفضة : معامل حراري سالب (Negative temperature coefficient : NTC)

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

٣-٢- درجة الرطوبة : تؤثر درجة الرطوبة النسبية على اختبارات السمية ونتائج الاختبارات الحيوية للعديد من الكائنات المختبرة فيؤدي ارتفاعها إلى ٨٠% إلى انخفاض سمية العديد من السموم كمركب الدنت و زرنیخات الكالسيوم و الكلوردين للذباب المنزلي عما في حالة كونها ٤٥% مع تثبيت درجة الحرارة .

٣-٣- الضوء : تؤثر طول فترة الإضاءة و نوعيتها على مدى نشاط بعض الكائنات مما يؤثر بدوره بطريق غير مباشر على كمية ما يلتقط من المركب فالذباب يلتقط ٢٥% من مركب الدنت و ٦ أمثال الديلدرين في الظلام عن الضوء .
كما يؤثر الضوء بطريق غير مباشر على سرعة العمليات الحيوية والتحول الغذائي .

٣-٤- التغذية : حيث يؤثر نوعية وكمية الغذاء المقدم قبل وأثناء الاختبار على درجة تحمل الكائن المختبر لتأثيرها على الوظائف الحيوية و الفسيولوجية بالجسم فزيت الزيتون كدهن يرفع درجة تحمل الذباب المنزلي لمركب الدنت وزيادة المحتوى النتروجيني تزيد وزن الجسم وفترة حياته كما يبرقات الدرويسفولا و بالتالي تزيد مدى تحملها لمركب الدنت .

٣-٥- تأثير الكثافة العددية للكائن (Population density) فتؤثر بطريق غير مباشر على مدى استجابة هذه الكائنات للمركب المختبر فالكائنات المرباه في مجموعات كبيرة ومتراخمة تؤدي 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 تأثيره للمركب.