

الباب الخامس
التحليل البيولوجي

obeikandi.com

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 لا بد من تأكيد النتائج Results Confirmation بعمل مشتقات بتفاعل هذا المكون (لو وجد) مع كيمائيات 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 كيميائية أو طبيعية كيميائية مع طرق بيولوجية . وقد يكون هذا المكون غير متعرف عليه ولم نصل بعد لطريقة لفصله أو تقديره والكشف عنه ؛ لذا تجرى عليه إحدى الاختبارات البيولوجية لتأكيد أثره السام أو الضار ، لو كان له مثل هذه الآثار .

ومن الاختبارات البيولوجية :

١ - اختبار الجلد :

يجرى عادة على الأرانب أو الجرذان بإذابة المركب أو المكون أو مستخلصه في مذيب معين مثل خللات الإيثايل النقية ، ويعرض 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 - 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 المهترزة ، وذوي البقع الدموية أو المشروخ ، أو ذي القشرة المعيبة وغيره من الشذوذ . كما يوضع البيض في كراتين جديدتين ، ويكون البيض خالياً من Pullorum typhoid ، وسالبا لـ Mycoplasma gallisepticum ، وأن يكون وزن البيضة ما بين ٥٩-٦٧ جم ، وأن يكون الوقت بعد الوضع أقل من ٤٨ ساعة ، ويخزن على ٦٠°ف (١٥,٥م) ، ورطوبة نسبية ٨٠٪ ، وأن تكون خصوبته أعلى من ٨٥٪ ، وأن يكون من قطيع غير معامل بالمضادات الحيوية أو مركبات زرنيخية أو نيتروفورازونات .

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 ٣ نمرة لتفادي التلويث به عند استخدامه . يعمل ثقب بقطر ٥م في مركز الخلية الهوائية بحيث تخرج القشرة للخارج بواسطة ثاقب Drill البيض ذي قاطع نمره ١٧٨ . أزل غشاء القشرة المرئي بملقط معقوف طول ١١٥م . باستخدام محقن ١-١٠٠ ميكرو لتر وإبر منخنية (بطول ٢٥-٣٧م مقاس ٢٢-٢٧) تعمل بزاوية ٩٠° . وزع كمية العينة المطلوبة على غشاء البيض مع الحرص ألا تخترق الإبرة الغشاء . في الحال سد الثقب بقطعة من شريط السيلوفان اللاصق عرض ٢,٥سم 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 تخضيناً 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 و اترك البيض للفقس والجفاف (في اليوم ٢٢ أو ٢٣) . افتح وافحص كل البيض غير الفاقس وافحص الكتاكت الفاقسة وسجل الملاحظات .

عادة يذاب المركب المدرس 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 ما بين التركيز ولوغاريتم نسبة النفوق % . وتقدر (LD₅₀) أي الجرعة المميتة لنصف عدد البيض .

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

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

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

٣ - 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 كيميائية 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 كبيراً 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 للجردان أو الأرانب فإنه قد لا تظهر السمية الجلدية قبل عدة أيام ، بالإضافة للتدخلات الكثيرة للمذيب ولكونات المستخلص الأخرى وللاختلافات الفردية .

وليس نفيًا لما سبق ذكره من أن الطرق البيولوجية أقل حساسية وأقل تخصصاً عن الطرق الطبيعية الكيماوية ، فإن الطرق البيولوجية تؤكد الكل عدم تخصصها ، لكن يثبت البعض حساسيتها الكبيرة خاصة لمركبات سامة بعينها أو سامة خلويًا Cytotoxic ، فقد استخدم زهور نبات الدخان واستخلص منها حبوب اللقاح ، وأضيفت تركيزات مختلفة من السموم الفطرية المحتوية على مجموعة Epoxytrichothecene-12, 13 (وهما التوكسينان T₂ ، Diacetoxyscirpenol) إلى معلق حبوب اللقاح وتم تسجيل النسبة المثوية لتشبيط 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 توكسينين . وهذا الاختبار الأخير يوضح أهمية وبساطة بعض الاختبارات البيولوجية الذي من السهل إجراؤها في المعمل دون تعقيدات وهي مكتملة للاختبارات الكيماوية .

وقد استخدمت خلايا طلائية الإنسان كذلك لدراسة السمية الخلوية لعدد ٣٣ سم 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 .

- AOAC (1965) Association Of Official Agricultural 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 .

obeikandi.com