

أساسيات التقييم الحيوى للمبيدات

Pesticide bioassay principles

للفرقة الرابعة قسم وقاية النبات (شعبة مبيدات)

للاستاذ الدكتور/ منى عبد النبى عبد الرسول

أدى اكتشاف وتخليق المركبات ذات السمية العالية
والتي تستخدم فى مكافحة الآفات ومسببات أمراض
النبات والمتطفلات التى تصيب الإنسان وحيواناته
المزرعية الى ضرورة ايجاد طرق دقيقة لتقدير او
قياس الكميات القليلة او المتناهية الصغر منها.

● كذلك اختبار فعالية المركبات على الآفات او
المفاضلة بين المركبات وبعضها وكذلك معرفة تأثيرها
المباشر او الغير مباشر على النبات والحيوان ومكونات
البيئة. فظهرت الطرق الكيميائية والحيوية ولكل منها
مميزات وعيوب او نقاط ضعف ويمكن القول بان كلتا
الطريقتين مكملتان لبعضهما.

مميزات الطرق الكيميائية

السرعة والحساسية العالية وامكانيتها فى تقدير كميات صغيرة جدا من المركبات وصفيًا وكميًا لذلك فهي المفضلة او المعتمدة فى تحديد نوع وكمية المركبات فى النباتات او المنتجات الغذائية قبل السماح بتسويقها.

ومن نقاط الضعف فى الطريقة الكيميائية

التكلفة العالية حيث انها تحتاج الى أجهزة خاصة واستعداد معملى خاص وايدى عاملة مدربة.

- تحتاج الى خطوات استخلاص وتنقية ليست بالسهولة بالامكان.
- أحيانا لاتستطيع التمييز بين المشابهات المختلفة لنفس المركب رغم اختلافهما فى مستوى السمية.

مميزات الطرق الحيوية :

● تحديد فعالية المركبات وتقدير الكميات الصغيرة نوعيا وكميا باستخدام كائنات حساسة.

● يمكنها التمييز بين المشابهات التي تختلف في التأثير الحيوى وتتشابه في التركيب الكيميائى.

● أى أن الطرق الحيوية تعطى صورة عملية وصحيحة وغير مكلفة عن فعل المادة او المركب على الافة.

القصور أو عيوب الطرق الحيوية:

١- شديدة الحساسية للظروف البيئية

٢- تحتاج الى تدريب وتكرار وممارسة للقائمين باجرائها

٣- بطئها واحتياجها الى اعداد كبيرة من حيوانات التجارب لإعطاء نتائج متجانسة.

الخطوات أو الإجراءات التي تستخدم في تقدير العلاقة بين العوامل النشطة فسيولوجيا وتأثيرها على الكائن الحي يهتم بها علم التقييم الحيوي **Biological assay** أو **Bioassay**.

● عرفه العالم Finney بأنه: " قياس فعالية اي مؤثر سواء كان طبيعيا او كيميائيا او حيويا او فسيولوجيا او نفسانيا بواسطة التفاعل الذي يحدثه في المادة الحية،"

وعرفه 1962 Hoskins & Craig بأنه:- " طرق تحديد العلاقة بين عامل
نشط فسيولوجيا والأثر الذى يحدثه فى الكائن الحى". لتفهم ذلك دعنا نتخيل
ان التأثير الذى يحدثه فى الكائن الحى مثلا (نسبه الموت) E فانها تكون
نتيجة محصلة مجموعة من العوامل التى تؤثر على هذا الكائن مثلا كمية
المادة الكيميائية a وطول فترة التعرض t ودرجة الحرارة T والظروف
البيئية e والحالة الفسيولوجية للكائن تشمل الجنس والعمر والظروف
الغذائية... الخ.

● اى انه رياضيا يمكن التعبير عن ذلك بالمعادلة: $E = f(a, t, T, e, p, \dots)$
etc.

ولتقدير التأثير البيولوجى الذى يحدثه مركب كيميائيا... مبيد مثلا يجب ان
تكون جميع العوامل الاخرى ثابتة او تأثيرها منعدم

طرق التقييم الحيوى

اولا: قياس الفعالية Measurements of potency

فى مثل هذه التجارب فان المركب او المبيد او عامل المكافحة متغير غير معروف حيث يقيم باستخدام سلالة حساسة او قياسية من الحشرات مثلا. ويقع تحت هذا القسم الابحاث التالية:-

● دراسة فعالية المركب الجديد

● اختبارات المفاضلة لاختيار مركب اكثر فعالية على افة معينة

(screening test).

● اختبارات التأثيرات للمركبات كمعقات كيميائية

● اختبارات فعالية العوامل الميكروبية (بكتريا – فطر – فيروس

– بروتوزوا)

● استخدام الحشرات كوسيلة لقياس كمية المبيدات او عوامل

المكافحة.

بالنسبة للمبيدات الحشرية

هناك نوعان من الأبحاث تجرى عليها.

(١) الأبحاث الروتينية

(٢) الاختبارات الأساسية

* الأبحاث الروتينية على المبيدات الحشرية تشمل:

(أ) اختبارات المفاضلة
Screening test

(ب) المقارنات المتخصصة
Comparison

أولاً: الأبحاث الروتينية على المبيدات الحشرية

(أ) اختبارات المفاضلة Screening test

- من اختبارات المفاضلة والتي تجرى فى المعامل التجارية او فى مراكز الأبحاث يتم اختبار عدد كبير من المركبات العضوية وذلك للبحث عن مبيد حشرى جديد.
- هذه التجارب تعرف بالتجارب الابتدائية وعادة مايجرى فيها اختبار نوع واحد من الفعل السام للمبيد الحشرى.
 - كسم معدى
 - او كمدخن مثلاً
- ولتحديد الفعل السام عادة مايستخدم انواع حشرية مختلفة فى هذا الاختبار.

ب- بالنسبة للمقارنات المتخصصة

● عندما يستخدم مبيد معين لمكافحة آفة معينة فإنه يكون من المرغوب تحديد فعاليته تحت الظروف الحقلية والتي تعتمد فيها النتائج ليس فقط على سمية المادة ولكن أيضا على الثبات الكيميائي والفيزيائي وذوبانه وصفاته الطبيعية.

● لذلك فإن اختيار طريقة المعاملة مثل المعاملة بالحقن او المعاملة السطحية لتحديد الجرعة المميتة للأفراد لن تكون كافية لمدنا بالمعلومات مقارنة بالتجارب التي تتضمن عوامل طبيعية تؤثر على تلك النتائج اذا ما أجريت حقليا.

على سبيل المثال:-

● مقارنة سمية متبقيات المبيدات على الخشب او الطين الجاف او اوراق النبات نجدها تختلف اذا ما قورنت سمية هذه المركبات المجهزة تحت الظروف الحقلية حيث تتداخل سمية المواد النشطة سطحيا والمواد الخاملة بالإضافة الى العوامل البيئية فى التقدير.

● لذلك يجب ان يتبع التجارب المعملية بتجارب حقلية على نطاق ضيق ثم على نطاق واسع ، وهذا يكون افضل معيار رغم تكاليفه المرتفعة وبطئه وصعوبة تكرار نتائجه نظرا للاختلافات الكبيرة التى تحدث نتيجة الظروف الحقلية. ويفضل ارجاء هذه الاختبارات الموسعة إلى ما بعد تحديد مركبين أو ثلاثة تكون فعالة تحت تلك الظروف المعملية.

ثانياً: الاختبارات الأساسية على المبيدات الحشرية

● وتشمل المتعلقة بالخواص الكيميائية والسمية

Chemical properties and toxicity

● علاقات الجرعة والاستجابة والتأثير التنشيطي

Dose-effect relations & synergism

- فعندما يتم البحث عن مبيدات جديدة فإنه أحياناً ما يحدث صدفة أن نجد أن مجموعة من المركبات لها تأثيرات سامة وبملاحظة اختلاف بعض الذرات في تلك المركبات نجد أن السمية تزداد أو تقل. لذلك فإنه يتم دراسة العلاقة بين الخواص الفيزيائية - الكيميائية والفعل السام وتجرى هذه التجارب معملياً.

- وايضاً التجارب التي تجرى لدراسة علاقة الجرعة بالاستجابة وكذلك دراسة الفعل التنشيطي أو التضاد عند خلط المواد السامة مع بعضها تحتاج إلى طرق قياسية دقيقة وتجرى معملياً.

الابحاث على المعقمات الكيميائية

Research on chemostrilants

● تعرف المعقمات الكيميائية بانها المواد الكيميائية التي تقلل او تمنع التكاثر للحيوان المعامل والتأثير ليس قاتل مباشرة. ولكنه يختلف عن فعل المبيدات التقليدية.

وبالنسبة للطرق المعملية التي تستخدم في اختبار المعقمات الكيميائية لا تختلف عن الطرق المعروفة بالنسبة للمبيدات.

● ويختلف فعل المعقمات عن المبيدات حيث ان المبيدات تأثيرها قاتل بينما المعقمات تؤدي فعلها التعقيمي عن طريق تأثيرها في منع تطور ال sperm او ova او تفقد الخصوبة للأفراد الناتجة فمثلا تؤدي الى احداث طفرات ضارة ويلاحظ ذلك من خصوبة الافراد. وعند التركيزات العالية للمعقمات الكيميائية ممكن ان يحدث تأثير مباشر على الحشرات المعاملة سواء موت او قصر فترة الحياه او تغيرات سلوكية.

اختبارات المضادات الحيوية والعوامل الميكروبية

Test of Microbial control agents and antibiotics

- في التجارب المعملية عند اختبار الممرضات من الكائنات الدقيقة على الحشرات فان الطرق المتبعة في معاملة الحشرات لاتختلف عن المبيدات الحشرية او المعقمات الكيميائية، حيث تستخدم مثلا طريقة المعاملة عن طريق الفم oral وذلك من خلال خلط المادة مع الغذاء.
- هناك بعض الدراسات بينت ان هناك علاقة بين كمية جرعة الممرض ونسبة الموت.
- ليس ضروريا ان يكون هناك علاقة مباشرة بين نسبة الموت ولو غار يتم الممرض النشط، حيث وجد ان بعض الكائنات الدقيقة يعزى تأثيرها السام الى المواد الكيميائية التي تنتجها. على سبيل المثال:-
البكتريا من النوع *Bacillus thuringiensis* (B.T) تفرز Exotoxin عبارة عن بلورات من البروتين وهناك مضادات حيوية كيميائية تنتج بواسطة فطريات معينة.

التقييم الحيوى للمبيدات الفطرية والبكتيرية

■ الصفات والتراكيب الفطرية التى تتأثر بالمواد الكيميائية

■ معدل النمو fungus growth

■ الشكل المورفولوجى للمزرعة الفطرية

■ انبات الجراثيم

■ انقسام الخلايا الفطرية ونفاذها

■ تنفس الفطر

الادوات والأجهزة اللازمة لمعمل تقييم مبيدات للفطريات والبكتيريا

- (١) الاوتوكلاف كوسيلة من وسائل التقييم الضرورية
- (٢) الفرن كوسيلة من وسائل التجفيف للأدوات الزجاجية ولتعقيمها
- (٣) الحضانات لتوفير درجة الحرارة المناسبة لنمو الفطريات او البكتيريا
- (٤) الميكروسكوب للتعرف على الفطريات المختلفة والتعرف على مدى انبات الجراثيم وكذلك التعرف على البكتيريا ونموها وشكل مستعمراتها
- (٥) ادوات زجاجية مثل اطباق بترى – انابيب اختبار – ماصات – دوارق مخروطية – دوارق معيارية – شرائح
- (٦) ادوات اخرى متنوعة مثل ادوات التشريح – قطن طبي حوامل انابيب – اكياس – اصص – لهب بنزن – شاش – وخلافه

البيئات اللازمة لنمو الفطريات والبكتريا

• (أ) البيئات الفطرية

• ١- البيئات الطبيعية مثل

• Rice grain , Apple Juice potato Dextrose Agar (PDA)

• Malt Extract Agar , corn Meal Agar

• (ب) البيئات التركيبية مثل

• (١) بيئة تشابك Czapek's solution

• وتتركب من : 3.0gm Sodium nitrate

• 1.0gm Pot. Monhydrogen phosphate

• 0.5gm Magnesium sulphate

• 0.5gm Pot. Chloride

• 0.01gm Ferrous sulphate

• 30.0gm Sucrose

• 1.0L Distilled water

• ويضاف اليها الآجار عند تحضيرها فى صورة صلبة بنسبة ١,٥ - ٢ % وهى مناسبة لتربية معظم الفطريات

٢) البيئة الحمضية التركيبية Semi synthetic Media مثل:

١- بيئة مولت تشابك اجار Malt Czapek's Agar

٢- بيئة مستخلص الخميرة تشابك اجار

Yeast Extract Czapek's Aga

٣- بيئة ليونيان اجار

• * بيئات البكتريا مثل :

• Nutrient growth Agar Media , PDA , Leonian's solution Agar

• تعقيم الادوات والبيئات

• (١) بالهواء الساخن

• (٢) بالبخار تحت الضغط

• (٣) بالإشعاع

• (٤) بالمواد الكيماوية

تقييم فعالية المبيدات الفطرية

- طرق اساسية Basic Bioassay techniques
- طرق عملية Practical Bioassay techniques
- الطرق الاساسية تتم فى عدم وجود عائل المسبب المرضى **in vitro** وتستخدم للدلالة على تأثير المادة المختبرة ضد الفطريات ام لا بينما الطرق العملية تتم فى وجود العائل وتحت الظروف البيئية.

تقييم فعالية المبيدات الفطرية

هناك ثلاث طرق اساسية لاختبار السمية الفطرية

• (١) اختبار التأثير على النمو الفطري **The fungus growth testes** تتم من خلال دراسة تأثير المادة الكيميائية على تثبيط النمو الفطري في بيئة الفطر.

• (٢) اختبار التأثير على انبات الجراثيم **The spore germination testes** حيث تقدر نسبة انبات الجراثيم في بيئة مائية تحتوى على المادة الكيميائية المختبرة.

• (٣) اختبار التأثير على تنفس الفطر **The Respiratory Fungus testes** حيث يدرس معدل تنفس الفطر في وجود المادة الكيميائية المختبرة

١- اختبار التأثير على نمو الفطر

• تتم هذه الاختبارات من خلال خلط المادة الكيميائية المراد اختبارها بالتركيز المناسب مع البيئة الغذائية سواء كانت صلبة او سائلة. ومنها الاختبارات التالية:

• * تجربة الحد الادنى السام فى انايب اختبار

• والغرض منها دراسة حدود التركيزات المستخدمة فى التجارب

الخاصة لدراسة تأثير المبيد حيث تخلط البيئة مع المركب ومعلق الجراثيم

والمحلول المنظم تحت ظروف تعقيم وتسجل درجة النمو وصفا للجراثيم

(-عدم نمو ، + نمو بسيط ، ++ نمو اعلى ، +++ نمو اكثر فى cont)

• التأثير على هيفات الفطر فى دوارق مخروطية

• فى هذا الاختبار يتم دراسة تأثير المبيدات الفطرية وتركيزاتها

المختلفة على نمو الهيفات الفطرية فى البيئات السائلة.

• النمو الهيفى فى الكونترول – النمو الهيفى فى المعاملة

• $\% \text{التثبيط للنمو الهيفى} = \frac{\text{النمو الهيفى فى الكونترول}}{\text{النمو الهيفى فى المعاملة}} \times 100$

النمو الهيفى فى الكونترول

• يحسب بعد اكتمال النمو الهيفى فى control حيث يرشح ويوزن فى كل

من المعاملات والمقارنة وترسم العلاقة بين النسبة المئوية للتثبيط مع

التركيزات للحصول على خط السمية على ورق نصف لوغاريتمى او

ورق بروبيت وتحسب قيمة ED₅₀ وتقارن المركبات مع المبيد القياسى

طريقة تجهيز معلق الجراثيم

- يضاف كمية من الماء المقطر المعقم على مزرعة الفطر المختبر المكون جراثيم وعن طريق ابرة التثريح يتم تقليب جراثيم الفطر مع الماء ويتم الترشيح عن طريق شاش معقم وتحت ظروف تعقيم وتعد الجراثيم تحت شريحة الهيموسيتوميتر .

• كيفية عد جراثيم الفطر

- عن طريق شريحة عد الجراثيم Haemocytometer والتي تستخدم لعد كرات الدم الحمراء وهي تحتوى على مربع غائر فى منتصفها ابعاده 1،1،1 سم – والمربع الغائر مقسم الى 25 مربع متوسط ابعاده 0.2، 0.2، 0.1 سم وهذا المربع المتوسط مقسم الى 16 مربع صغير ابعادها 0.05، 0.05، 0.1 مم وتحت الميكروسكوب يتم عد الجراثيم.

على افتراض ان المربع الصغير يحتوى 2 جرثومة

$$0.05 \times 0.05 \times 0.1 \text{ ----- } 2 \text{ spores} \quad \bullet$$

$$1 \text{ (ml) } 10^3 \text{ mm}^3 \text{ ----- } X \quad \bullet$$

$$10^3 \times 2$$

$$X \text{ spores/ml} = \text{-----} = 8 \times 10^6$$

$$5 \times 5 \times 1 \times 10^{-5}$$

$$8 \times 10^6 \text{ spores} \times ? = 5 \times 10^5 \times 100$$

$$\frac{5 \times 10^7}{8 \times 10^6} = \frac{50}{8} = 0.25 \text{ ml} + 93.75 \text{ ----- } \text{ماء مقطر معقم}$$

اختبار النمو الفطري في بيئة صلبة

• يقاس النمو الفطري عند وصول النمو الفطري الى نهاية الطبق في أي من المعاملات او المقارنة.

• وتحسب النسبة المئوية للتثبيط من المعادلة التالية

$$\% I = \frac{C - T}{C} \times 100$$

• وتحسب قيمة ED₅₀ لمقارنة المركبات ويراعى عمل stock في

حدود ٣٠ جزء في المليون في حجم نهائى ١٠٠ مل تحت ظروف

تعقيم

اختبارات نطاق التثبيط Inhibition zone Techniques

في هذا النوع يتم خلط بيئة الآجار المغذى مع معلق جراثيم الفطر في اطباق بترى معقمة والمادة الكيميائية توضح في وسط الطبق حيث تنتشر خلال بيئة الآجار فيحدث نطاق دائرى من التسمم حول وسط الطبق. ويتوقف نطاق التثبيط على معدل انتشار المادة السامة خلال بيئة الآجار المغذى وتقدر فاعلية المركب بقياس نطاق التثبيط للنمو الفطرى.

• يكون تركيز معلق الجراثيم داخل مولت الآجار هو ٠.٥ - ١.٠ ×

٦١٠ جرثومة/مل

• ويجب ان يكون هناك مبيد قياسي معروف له تأثير على

الفطريات التي تكون جراثيم والذي يعتبر مرجع Reference

• تحسب النسبة المئوية للتثبيط من المعادلة

• T

• $\text{Relative Toxicity (RT) \%} = \frac{\text{-----}}{\text{C}} \times 100$

• C

• حيث T منطقة التثبيط في المعاملة

• C منطقة التثبيط في المبيد القياسي

• وترسم على ورق بروبيت بين التركيز ونسبة %RT

تقدير كفاءة معاملة البذور بالمبيدات الفطرية

Determination of the efficiency of seed treatment

يمكن تقدير كمية المبيد الموجودة على البذرة المعاملة من خلال عمل منحنى قياسى للمبيد باختبار سلسلة من التركيزات ثم توضع البذرة بعد معاملتها بهذه التركيزات فى الطبق كما سبق فى تجربة اقراص ورق الترشيح ويوضع التركيز المجهول فى منتصف الطبق ومن قياس منطقة التثبيط يمكن رسم العلاقة بين التركيز ومنطقة التثبيط ليعطى خط مستقيم وبمقارنة التركيز المجهول مع المنحنى القياسى يستدل على الكمية المعاملة بها البذرة.

٢ - اختبارات انبات الجراثيم

The spore Germination techniques

(أ) طريقة استخدام شريحة الانبات

• (١) طريقة Reddick & Wallace

يتم رش شرائح زجاجية بمحلول المبيد- بعد جفاف الشرائح تضاف قطرة من معلق الجراثيم وتحضن الشرائح ويجرى عدّها وحساب نسبة الانبات وتقارن بالمقارنة.

• (٢) طريقة Horsfull

يضاف حجم معين من محلول المبيد في تجويف بمركز الشريحة ويضاف معلق الجراثيم وتحضن ثم يعد ويحسب نسبة الانبات.

• (٣) طريقة Montgamery & Moor

يضاف قطرات من محلول المبيد بالماصة على شريحه زجاجية عادية
ثم يضاف معلق الجراثيم بعد جفاف المبيد .

• (٤) طريقة Tamura

يستخدم طبق بتري بدلا من الشرائح مع وضع المبيد بواسطة الماصة العادية

• (٥) طريقة التخفيف فى انابيب الاختبار

حيث تحضر سلسلة من محلول المبيد فى انابيب ويضاف حجم من
معلق الجراثيم ومعه مادة منشطة وتضاف نقطتين على الشريحة

- (ب) اختبار انبات الجراثيم على سطح الاجار Agar plate Germination
- يستخدم للمركبات التي لاتذوب فى الماء ولكن قابلة للامتزاج به حيث تخطط تركيزات المبيد مع محلول الاجار المائى ويصب فى اطباق بترى وبعد التصلب للبيئة يخطط سطح الاجار بجراثيم الفطر ويحضن ثم تقدر نسبة الانبات.

- (ج) اختبار الانبات فى دوارق مهتزة Shaker flask Germination
- يتم انبات جراثيم الفطر فى بيئة مائية تحتوى على المبيد الفطرى فى دوارق فى جهاز رج طول فترة الاختبار.

• (د) اختبار انتفاخ الجراثيم Cell Volume Assay method

يعتمد على زيادة حجم الجرثومة اثناء الانبات وهذا يكون اقل في وجود المبيد.

• الحجم النهائي في وجود المبيد – الحجم الابتدائي

• % للتثبيط في الحجم = $\frac{\text{الحجم النهائي في وجود المبيد} - \text{الحجم الابتدائي}}{\text{الحجم الابتدائي}} \times 100$

• الحجم النهائي في عدم وجود المبيد – الحجم الابتدائي

٣- اختبارات التأثير على تنفس الفطر

- يمكن عن طريق جهاز فاربورج Warburg قياس الاكسجين المستهلك او ثانى اكسيد الكربون المنطلق. يصلح هذا الاختبار للمركبات الموقفة للنمو

طريقة تقييم فعالية المبيدات البكتيرية

- طريقة العد الكلى للمستعمرات Plate-count technique
- طريقة نطاق منطقة التثبيط Inhibition zone technique
- طريقة تقدير العكارة Turbidimetric technique

١- طريقة العد الكلى للمستعمرات

يتم فيها خلط البيئة المغذية الصلبة Nutrient Agar مع المبيد البكتيري وتصب في اطباق بترى معقمة وبعد التصليب يضاف المعلق البكتيري ويفرد على السطح ويحضان لمدة ٢٤ ساعة او ٤٨ ساعة وتؤخذ النتائج بعد المستعمرات لكل طبق . وتحسب النسبة المئوية لتنشيط نمو المستعمرات من المعادلة:

المستعمرات في المقارنة - نمو المستعمرات في المعاملة

$$\bullet \quad \% \text{ للتنشيط} = \frac{\text{نمو المستعمرات في المقارنة}}{100} \times 100$$

نمو المستعمرات في المقارنة

• وتحسب قيمة ED₅₀ من الرسم على ورق بروبيت

٢- طريقة نطاق منطقة التثبيط

- يتم خلط البيئة المغذية مع المعلق البكتيري المعروف التركيز وتصب في اطباق بترى وبعد التصلب يقسم الطبق الى ٤ اقسام بقلم شمع يتم وضع ورق ترشيح مبلل بتركيز المركب في كل قسم ويحضان ويستخدم مبيد قياسي . وتحسب من المعادلة التالية.
- تحسب النسبة المئوية للتثبيط مقارنة بالمبيد القياسي
- منطقة التثبيط في المعاملة
- $\% \text{ للتثبيط النسبي} = \frac{\text{منطقة التثبيط في المعاملة}}{100} \times 100$
- منطقة التثبيط في المبيد القياسي

٣- اختبار تقدير العكارة للمزرعة البكتيرية

يتم خلط البيئة السائلة المغذية مع تركيزات المبيد البكتيرى فى انابيب اختبار ويضاف المعلق البكتيرى ويحضن ثم يتم تقدير العكارة على جهاز تقدير العكارة او جهاز تقدير الالوان colorimeter على طول موجه ٥٤٠ نانومتر.

• ملحوظة:

تسبب البكتريا الميتة ايضا عكارة اى ان هذه الطريقة ليست دليل كامل على نمو البكتريا.

التقييم الحيوى للمركبات الكيميائية على الحشائش

- * اغراض التقييم الحيوى ضد الحشائش
- تقييم فعالية وكفاءة مركبات كيميائية محضرة حديثاً
- تقييم فعالية وكفاءة مستخلصات طبيعية
- تقييم فعالية مبيدات حشائش بعد تخزينها
- تقييم فعالية مبيدات حشائش بعد استعمالها لسنوات واكتشاف صفة المقاومة
- تقييم فعالية مبيدات حشائش على نوع معين من الحشائش
- المقارنة بين سمية مجموعة مبيدات على نوع واحد من الحشائش
- المقارنة بين حساسية عدة انواع من الحشائش لأحد المبيدات

التقييم الحيوى للمركبات الكيميائية على الحشائش

- تقدير حساسية الاعمار المختلفة للحشيشة لاحد المبيدات
- تقدير التركيز المناسب للمكافحة
- تقدير طريقة التأثير السام
- تقدير السمية النباتية والتأثير الجانبى للمبيد على المحصول
- تقدير توزيع مبيدات الحشائش ومتبقياتها فى قطاع التربة
- تقدير صفة الجهازية لمبيد الحشائش
- تقدير كفاءة عملية الاختيارية لمبيد الحشائش
- تقدير مدى حدوث زيادة فى كفاءة مبيد الحشائش بالخلط او التأثير المشترك
- تعتمد طرق اختبار المركب كمبيد حشائش على درجة التأثير المباشر فى مرحله الانبات او بعد الانبات.

التقييم الحيوى للمركبات الكيميائية على الحشائش

- * يتم اجراء التقييم الحيوى للمركبات على عدة مستويات
- اولاً: التقييم الحيوى المعملى
- (١) **In situ tests** وهى الاختبارات التى تتم على النباتات فى مكانها الذى نمت فيه حيث تقاس العمليات الفسيولوجية مثل النتح- التمثيل الضوئى – التنفس فمثلا قياس التمثيل الضوئى للنبات يكون احد الطرق للتعرف على مثبطات التمثيل الضوئى.

• (٢) *In vivo* tests اختبارات داخلية

في حالة اذا كان المركب يتوقع ان يكون مثبت للتمثيل الضوئي

فيمكن قياس امتصاص CO_2 بواسطة Infra red gas

analyzer او قياس خروج O_2

• * مبيدات الحشائش التي تتداخل في مرحلة الانبات يمكن

الكشف عنها بواسطة اختبارات اطلاق بترى في وجود البذور

وتركيزات المبيد وحساب نسبة البادرات النابتة بعد ٣-٥ ايام او

طول المجموع الخضري والجذري بعد ٨-١٠ ايام

(٣) *In vitro* tests اختبارات خارجية.

- فمثلا يعزل الكلوروبلاست من النبات مثل اوراق السبانخ ويدرس تأثير مييدات الحشائش التي تثبط التمثيل الضوئى عليه حيث يحدث فى الكلوروبلاست تفاعلات اكسدة واختزال فى وجود مستقبل الكترولونات مثل ferric cyanide ويمكن قياس التغير فى المستقبل باجهزة الطيف او قياس الاكسجين المنطلق او امتصاص CO_2 او قياس الفلورسنس.

- وهناك اختبارات اخرى تعتمد على تقدير محتوى الكلورفيل. او تقدير الكاروتين. او تقدير الميتابوليت الاولية والثانوية للمركبات المختبرة بواسطة GC. وهناك اختبارات بيوكيميائية وانزيمية للكشف عن المركبات المثبطة للتخليق الحيوى للإحماض الامينية.

• (٤) Cell and tissue cultures مزارع الخلايا والأنسجة

- تستخدم فى حالة الغريلة لمبيدات الحشائش حيث ان مبيدات الحشائش المثبطة للتمثيل الضوئى تؤثر على البادرات اكثر من مزارع الانسجة والخلايا

• ثانيا: تجارب الصوب Green house trials

• تعتبر تجارب الصوب هي الطريقة الاكثر شيوعا لغربلة الكيماويات ودراسة فعاليتها كمبيدات حشائش. ويتم الاختبار بالصوب من خلال:

• (١) التطبيق بالتربة Soil application

وقد تكون التربة صناعية او طبيعية ويجرى التطبيق بالتربة اما:

• قبل الزراعة - حيث يوضع المركب فى التربة واذا كان متطاير

يخلط مع التربة وتضبط درجات الرطوبة والحرارة وتترك ثلاث

اسابيع للنمو.

- التطبيق قبل الانبثاق pre – emergence application
يتم تطبيق المركب على سطح التربة بعد زراعة البذور (غالبا يوم)

- التطبيق بعد الانبثاق post-emergence application

- (٢) التطبيق على المجموع الخضرى Foliar-application

- يتم التطبيق عندما يكون النبات فى طور ورقة او ورقتين حقيقيتين والشكل المورفولوجى لكل من المحصول والحشائش لها تأثير كبير على مبيد الحشائش واختياريته.

- (٣) الرش المباشر Direct spray

يستخدم عندما يكون التطبيق على المجموع الخضرى يسبب سمية نباتية للمحصول وهذه الطريقة شائعة فى حالة غريلة المبيدات فى الصوب.

• ثالثا: اختبارات حجرة النمو Growth chamber tests

- تستخدم اساسا لتقدير تأثير عوامل الضوء - الحرارة - الرطوبة - الري - الادمصاص ومحتوى Organic mater (المادة العضوية) حيث تقدر الاستجابة قبل وعند وبعد تطبيق المبيد.

• رابعا: الاختبارات فى صالة الزراعة Tests in vegetation hall

- تستخدم لحل مشكلة الصعوبة فى دراسة تأثير مبيد الحشائش تحت الظروف الطبيعية حيث انها توفر ظروف قريبة من الطبيعة - حيث تتكون من صوبة ومساحة مفتوحة فى الهواء وتوفر حماية للنباتات من الظروف القاسية مثل الرياح والمطر الشديد حتى الحصول على المحصول.

خامسا: الاختبارات الحقلية Field tests

- الاختبارات الحقلية تعتبر هي التطبيق العملي وهي المحددة لنجاح المركب حيث ان هناك عوامل بيئية مثل الضوء - الرياح والتربة - والعمليات الزراعية وطرق التطبيق تحدد نجاح او فشل المركب.

- (أ) الغريلة الحقلية Field screening

- مثل اختبارات الغريلة في الصوب حيث يتأكد منها حقليا. ويكون مساحة الوحدة التجريبية في حدود من ٢-١٠م^٢ وتطبق المركبات بنوع مناسب من الرشاشات مثل knapsack sprayer ويمكن اجراء التقديرات وصفا بمقياس من صفر الى ١٠٠% وبعد الغريلة تجرى التجارب الحقلية.

• (ب) التجارب الحقلية Field experiments

- قد تتواصل هذه التجارب الى ٢-٤ سنوات للتأكد من نجاح المركب تحت ظروف المحاصيل المختلفة والتربة والمناخ. والوحدة التجريبية من ١٠-٢٥م^٢ بنظام القطاعات العشوائية . ويؤخذ في الاعتبار السمية النباتية والنتاج النهائى Yield.

• (ح) التجارب التوسعية Large scale trials

- تتم كمرحلة اخيرة للتقييم الحيوى حيث تتم للمركبات التى نجحت فى الاختبارات السابقة.

• (د) تجارب تسجيل المركب Registration trials

- يتطلب التسجيل تجارب لمدة موسمين مع الالتزام بكل من توقيت التطبيق والادوات ومقاس وعدد القطع التجريبية وذلك حسب التخطيط القياسى للنظام المحلى او المنظمات الدولية ويؤخذ فى الاعتبار الناتج وجودة المحصول.

طرق التعبير عن نتائج التقييم ضد الحشائش

التعبير بالنشاط او الضرر ونظام التقييم كنسبة تتراوح بين صفر - ١٠٠%

• وعندما يكون lower index يدل على عدم وجود نشاط - Higher index يدل على نشاط عالى (قتل الحشيشة)

• ومن المعايير الاخرى: LD_{50} , ED_{50} , GR_{50}

• الوزن الرطب والجاف - الارتفاع - الطول - عدد الحشائش فى مساحة محددة
ومن هذه المعايير تحسب ED_{50} او حساب مقياس الاختيارية.

• ED_{50} crop

• $S = \frac{ED_{50} \text{ crop}}{ED_{50} \text{ weed}}$

• ED_{50} weed

• او Selectivity = weed response – crop response

والصورة العامة لدليل الاختيارية

• محصول ←----- ED₅₀ (species II)

• S = -----

• حشيشة ←----- ED₅₀ (species I)

• فاذا ازدادت قيمة Selectivity index (S) دلت الدرجة

الكبيرة على الاختيارية للمركب اى يؤثر بدرجة كبيرة

على الحشيشة بينما يؤثر على المحصول بدرجة قليلة

- ويمكن تحديد نسبة تأثير مقبول على المحصول والذي عندها لا يتأثر اقتصاديا مثلا عند ED_{10} أى عند نسبة ١٠% تأثير وأيضا يمكن قبول التأثير على ٩٠% فقط للحشائش وبالتالي يتم التعبير عن الاختيارية بالحدود المقبولة للمحصول والحشيشة فيكون:

$$S = \frac{ED_{50} \text{ (crop)}}{ED_{90} \text{ (weed)}}$$

- ويمكن تقسيم انواع الحشائش على اساس دلائل الاختيارية كما يلي:-
- هذه الحشائش لاتكافح بالاعتماد على هذه الاختيارية $S < 1$
- الاختيارية تدل على الحشائش التي يمكن ان تكافح $S = (1:2)$
- يمكن مكافحة هذه الحشائش بالاعتماد على هذه الاختيارية $S \geq 2$