

## 25. Toksikologiske eksperimenter med dafnier

Dafnier er standardorganismer til toksikologiske tests af nye stoffers giftighed. Der findes en række procedurer for udførelse af toksikologiske tests, bl.a.  $LC_{50}$ -tests (se vejledning 26, Bioassay) for miljøfremmede stoffer som udføres over 24 evt. 48 timer. Det kan være vanskeligt at overholde de krav der stilles i testlaboratorier, men det er heller ikke nødvendigt. I skal blot bruge naturvidenskabelig metode til at opstille forsøg med de stoffer I vil undersøge virkningen af, på dafnier.

### Fremgangsmåde

- Konstruer jeres eksperiment så det er muligt at se hvor stor indflydelse koncentrationen af stoffet har, og husk at sammenligne med kontrolforsøg.
- Efter 24 timer kan I finde resultatet ved at tælle hvor mange svømmende, dvs. levende, dafnier der er i glassene. Resultaterne sættes i forhold til dødeligheden i kontrolglasset.

#### Forslag til hvordan indholdsstoffer i cigaretter kan testes

Indholdet af en cigaret, dvs. tobakken, anbringes i 100 mL vand der er udtaget fra dafniekulturen. Husk handsker når I berører tobakken. Lad tobakken trække i vandet 1 time, så vandet får en pæn brun farve. Lav så en fortyndingsrække, se figur 25.1 side 78.

- Glas 1: Udtag 20 ml udtræk, tilsæt 5 mL vand med 10 dafnier, dette er den ufortyndede prøve.
- Glas 2: Udtag 5 mL fra glas 1, tilsæt 20 mL vand med 10 dafnier.
- Glas 3: Udtag 5 mL fra glas 2, tilsæt 20 mL vand med 10 dafnier.
- Glas 4: Kontrolglas, 25 mL vand med 10 dafnier.

Lad glassene stå under ensartede betingelser i 24 timer og optæl så antallet af levende dafnier i hvert glas.

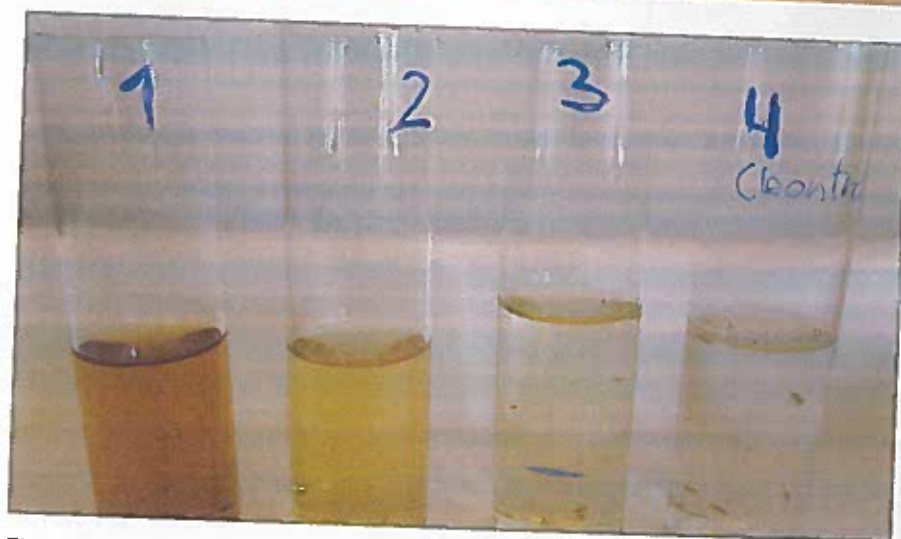
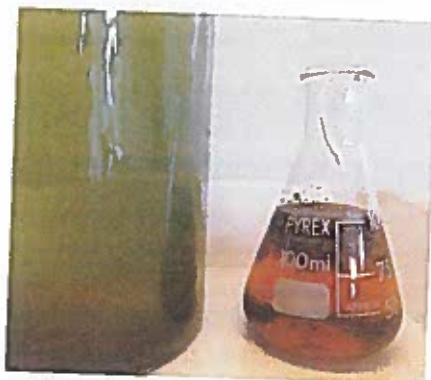
Overvej om I har lavet fortyndinger nok, måske er det nødvendigt at fortynde mere.



Hvilke egenskaber hos dafnier gør dem velegnede til standardorganismer i forbindelse med toksikologiske tests af stoffer?

### Materialer

- Stamkultur af dafnier
- Forsøgsglas (det kan være små bægerglas, store reagensglas eller bananflueglas), der skal gerne være mindst 3 cm vandsøjle
- Vandet i forsøgsglassene bør komme fra den oprindelige kultur
- Pipetter til at overføre dafnierne fra stamkultur til forsøgsglas
- Det valgte stof, gerne i fortyndingsrække  
Eksempler på stoffer: Indholdsstoffer i cigaretter, Cu (som kobberioner  $Cu^{2+}$ ), Roundup, andre pesticider, ethanol, kaffe osv.



Hvorfor skal I bruge  
vand fra dafniekulturen?

Figur 25.1. Opstilling af fortyndingsrække med dafnier som forsøgsdyr (cigaret-opløsning).

### Forslag til bearbejdning

Resultater kan afbildes i tabel eller grafisk. Lav gerne flere forsøgsrækker, evt. med forskellige cigaretmærker.

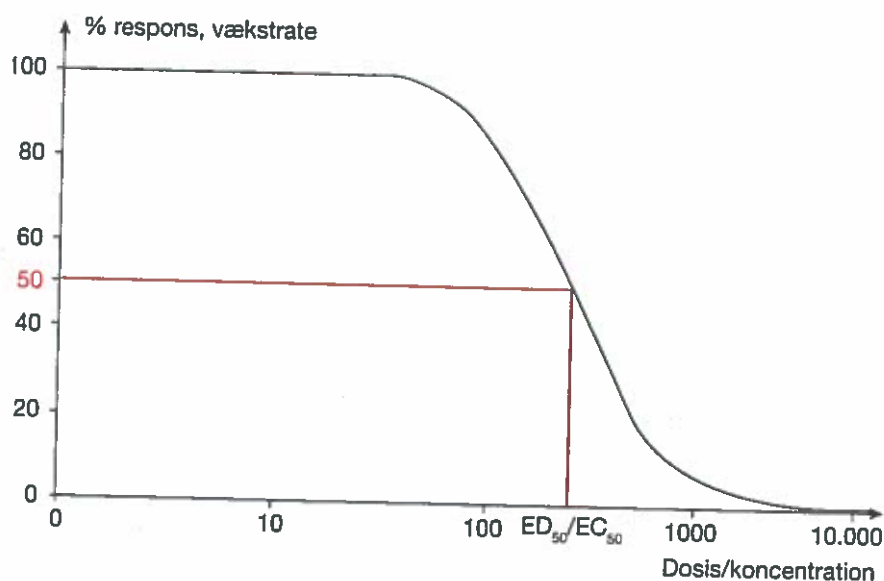
Se vejledning 24, Dyrkning og undersøgelser af dafnier, til andre forsøg med undersøgelse af stoffers indflydelse på dafnier.

Den biologiske virkning af giftstoffer på levende organismer kan dokumenteres vha. eksperimenter. De eksperimenter man laver, kaldes biologiske assays eller bioassays, og deres formål er at måle et stofs stimulering eller reduktion af livsytringer i dyr og planter.

I dette eksperiment anvendes andemad som biologisk organisme. Det er en vandlevende plante der formerer sig vegetativt, dvs. alle planter med samme moderplante er genetisk ens. Planten er velegnet til væksteksperimenter i laboratoriet, og vækstbetingelser kan designses på mange forskellige måder. I kan bruge mange andre vandplanter, ligesom det lille krebsdyr dafnien ofte er anvendt til økotoksikologiske tests.

Der findes forskellige bioassay-metoder og analyser af dem. En af disse er dosis-respons-modellen. Denne metode forudsætter at virkningen af et givet giftstof kan beskrives via en matematisk sammenhæng, enten som lineært eller ikke-lineært respons.

Responset kan være vækst, overlevelse eller en lignende målbar parameter. Man får en dosis-responskurve når respons afbildes som funktion af den dosis eller koncentration som test-organismen er blevet udsat for. Data fra en test vil ofte have et ikke-lineært forløb når responset bliver afbildet som funktion af dosis, hvis testen udføres i et område der både rummer meget små og meget store doser. Dette ses som en monotont stigende eller faldende doseringskurve med asymptotisk øvre og nedre grænse, en såkaldt S-formet kurve. Den dosis (D) eller koncentration (C) som har 50 % virkning, kaldes  $ED_{50}$  eller  $EC_{50}$  (E for effekt). Hvis responset er død, kaldes den  $LD_{50}$  eller  $LC_{50}$ , (L for letal, dødelig). I dette eksperiment registreres responset som en vækstrate hvor lille koncentration giver stor vækstrate, se figur 26.2.



Figur 26.2. Dosis-responskurve – respons som funktion af dosis/koncentration. 100 % respons er normal vækst.

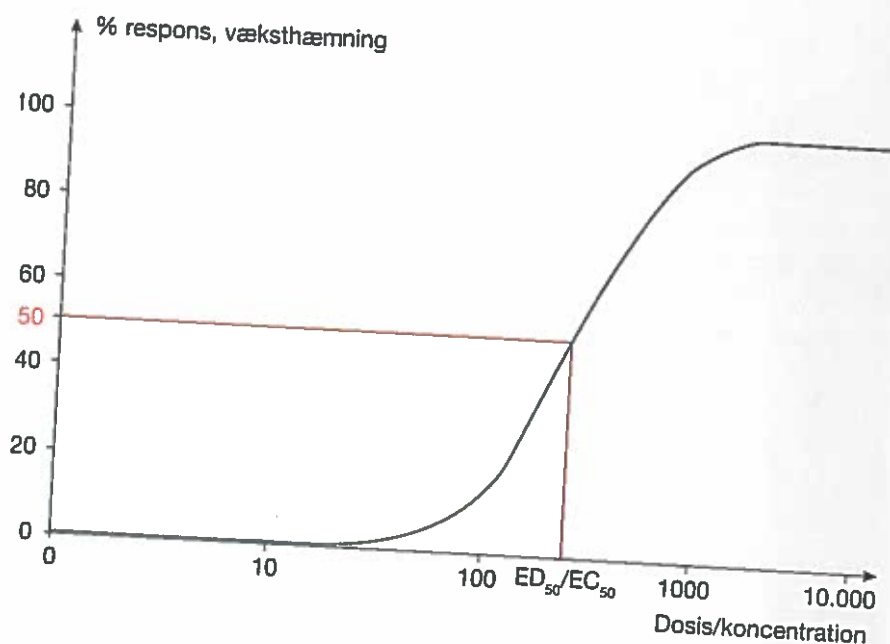


Figur 26.1. Andemad.



Figur 26.3. Dosis-respons hvor responset er væksthæmning. Høj koncentration af stof giver 100 % væksthæmning.

Men responset kan også være en væksthæmning hvor lille koncentration giver lille væksthæmning, se figur 26.3.



En grænseværdi tager højde for at der er forskel mellem arter. Grænseværdien fastsættes ud fra  $EC_{50}$ . Grænseværdien er et udtryk for en koncentration, hvor man antager at kemikaliet ikke har nogen effekt.

$$\text{grænseværdi} = \frac{EC_{50}}{\text{sikkerhedsfaktor}}$$

Sikkerhedsfaktoren ligger typisk mellem 100 og 1000 for eksperimenter med dyr og planter. Jo større usikkerhed der er ved eksperimentet, jo større sikkerhedsfaktor.

### Bioassay med andemad og hårshampoo

Denne vejledning er bekræftet med et konkret stof og doseringer. Ud fra dette testprincip kan I selv designe et lignende eksperiment. Her må I selv finde de relevante doseringer for det stof I vil teste, men databehandling og blanding af testmedium som fortyndingsserie kan foretages på lignende måde.

Biomassetilvæksten måles som antal blade ved almindelig tælling før og efter. Selv den mindste antydning af et blad tæller som et blad. Det er vigtigt at bladene tælles af de samme to personer begge gange for at reducere usikkerheden både ved start og ved slutning af eksperimentet. I kontrolprøverne forventes væksten at være eksponentiel, og kontrol-

lerne skal derfor tælles flere gange i løbet af testperioden. Vækstraten,  $r$ , kan beregnes ud fra følgende sammenhæng:

$$r = \frac{(\ln N_n - \ln N_0)}{t_d}$$

Hvor

$N_0$  er startbiomassen (målt som antal blade)

$N_n$  er slutbiomassen (målt som antal blade)

$t_d$  er længden af testperioden (målt i dage)



Diskuter om der er andre og mere hensigtsmæssige måder at måle biomassetilvæksten på.

## Fremgangsmåde

- Genetisk ens planter af andemad udsættes for forskellige koncentrationer af kemikalier i syv dage. Vækstraten bestemmes som biomassetilvækst og måles ved simpel tælling af antal blade før og efter. Husk konstant lys og temperatur.

- Opstilling af et assay laves ved hjælp af en fortyndingsrække hvor I halverer koncentrationen hver gang. Princippet i at lave en fortyndingsrække ses i figur 26.4.

Følgende vægtkoncentrationer i g/L testes:

10 - 5 - 2,5 - 1,25 - 0,625 - 0,312 og 0,156

Forbered fortyndingsserien så der er minimum 200 mL af hver koncentration.

## Materialer

- Andemad
- Hårshampoo
- 7 målekolber
- 16 bægerglas
- Husholdningsfilm eller Parafilm

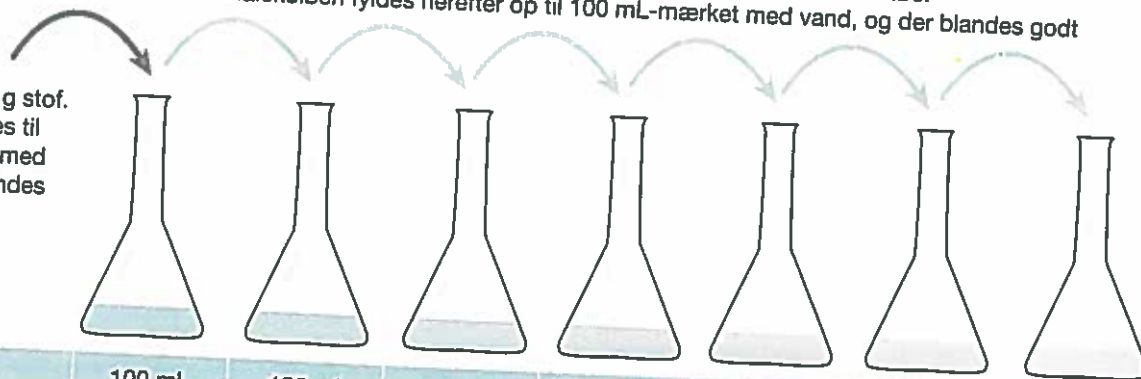
Figur 26.4. Princippet i en fortyndingsrække.

For hver blå pil herunder:

Der afmåles 50 mL som overføres til den næste 100 mL-målekolbe.

Målekolben fyldes herefter op til 100 mL-mærket med vand, og der blandes godt

Der afvejes 1,00 g stof. Målekolben fyldes til 100 mL-mærket med vand, og der blandes godt.



| Volumen               | 100 mL | 100 mL | 100 mL  | 100 mL   | 100 mL    | 100 mL    | 100 mL    |
|-----------------------|--------|--------|---------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Gram stof pr. 100 mL  | 1      | 0,5    | 0,25    | 0,125    | 0,0625    | 0,0312    | 0,0156    |
| Vægtkoncentration g/L | 10 g/L | 5 g/L  | 2,5 g/L | 1,25 g/L | 0,625 g/L | 0,312 g/L | 0,156 g/L |



Beregn på forhånd hvilke mængder I skal blande først, så I ender med at have to bægerglas med 100 mL af hver koncentration.

- I skal lave to ens prøver ved hver testkoncentration og et kontrolglas. Testene gennemføres med 100 mL testmedium.
- Overfør 2-3 sunde grønne planter med 2-4 blade på hver til hvert bægerglas.
- Notér antal af blade i skema, se figur 26.5.
- Bægerglassene overdækkes med plastfolie.
- Bægerglassene stilles under konstant temperatur og lys.
- Tæl bladene efter 6-7 dage.

Husk at biomassetilvæksten måles som antal blade ved almindelig tælling før og efter, at selv den mindste antydning af et blad tæller som et blad og at bladene tælles af de samme to personer hver gang. I kontrolprøven forventes væksten som nævnt at være eksponentiel, og kontrollerne skal derfor tælles flere gange i løbet af testperioden.

### Forslag til bearbejdning

- Beregn vækstraten i alle prøver. Hvis vækstraterne i to ens prøver er væsentlig forskellige, noteres det, og årsager diskuteres.

Figur 26.5. Skema til optælling af antal blade.

| Koncentration g/L | 10,00 |   | 5,00 |   | 2,50 |   | 1,25 |   | 0,625 |   | 0,312 |   | 0,156 |   | Kontrol |   |
|-------------------|-------|---|------|---|------|---|------|---|-------|---|-------|---|-------|---|---------|---|
|                   | A     | B | A    | B | A    | B | A    | B | A     | B | A     | B | A     | B | A       | B |

Antal blade

Starttælling

Dato:

Antal blade

Sluttælling

Dato:

Vækstraten

$$r = \frac{(\ln N_n - \ln N_0)}{t_d}$$

Gennemsnitlig  
vækstrate

Vækstrate i %  
(kontrol sættes  
til 100 %)

- Udregn den gennemsnitlige respons for hver koncentration idet kontrollens vækstrate sættes til respons på 100 % og koncentration 0 g/L.
- Tegn koncentrations-responskurven.
- Aflæs  $EC_{50}$  og beregn en grænseværdi på basis af  $EC_{50}$ .
- Undersøg hvilke stoffer shampooen indeholder og hvis det er muligt deres toksicitet (giftighed).
- Diskutér usikkerheder ved eksperimentet.

Kilde til forsøgside med shampoo-andemad: Ole Kusk og Kåre Press-Kristensen, DTU Miljø.

## 27. Eksperiment med habitat-præference

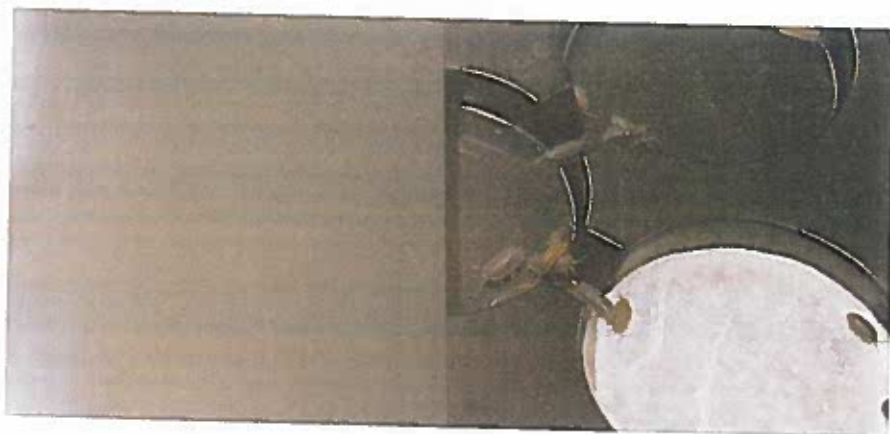
Alle organismer kræver bestemte miljøforhold for at kunne overleve og formere sig. Kravene til leveforholdene er forskellige fra art til art, og dyrene vil derfor udvise præference for de betingelser der passer dem bedst i et givet miljø.

Miljøet består af abiotiske faktorer som fx temperatur, ilt-, lys- og fugtighedsforhold samt biotiske faktorer som fx rovdyr, byttedyr, plantedække, sygdomsfremkaldende mikroorganismer og konkurrence fra egen eller andre arter.

### Fremgangsmåde

Præferencepladen vist i figur 27.1, leveres med en mørk og en gennem-sigtig plade. Hvis den mørke plade dækker den ene sides kamre og der er lavet fugtigt miljø i de øverste kamre, har I fire forskellige kombinationsmuligheder på én gang. Kombinationer med færre valgmuligheder kan der også være en pointe i at udføre.

Den gennemsigtige plade sørger for at dyrene ikke undslipper kammeret.



### Materialer

- Dyr, fx bænkebidere
- Præferenceplade som figur 27.1 eller lignende
- Filtrepapir
- Jord
- Sand
- Fødeemner eller andet der indgår i dyrenes præference og jeres undersøgelse

Figur 27.1. Præferenceplade der gør det muligt at variere betingelserne på flere måder.