Επεξεργασία & Διαχείριση Τοξικών και Επικινδύνων Αποβλήτων (ΜΠ 438)

Εργαστήριο 1ο.

Εκτίμηση τοξικότητας υγρών δειγμάτων (πχ. στραγγισμάτων ΧΥΤΑ)

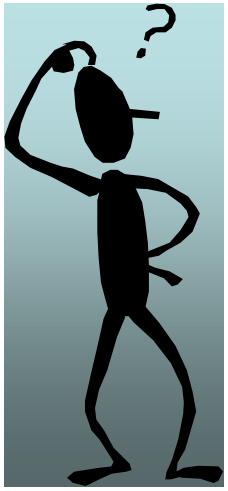
Σκοπός: προσδιορισμός της **τοξικότητας** αγνώστου υγρού δείγματος

<u>Στο εργαστήριο αυτό μας δίνετε ένα άγνωστο υγρό δείγμα και καλούμαστε να απαντήσουμε εάν είναι τοξικό ή όχι.</u>

Τι ενέργειες/ αναλύσεις θα κάνατε για να απαντήσετε εάν ένα δείγμα είναι τοξικό ή όχι?

<u>Απάντηση:</u> Ο κλασσικός τρόπος είναι να πάρουμε το δείγμα και να αρχίσουμε να κάνουμε αναλύσεις.

Αλλά θα πρέπει να γνωρίζουμε λίγο τι ψάχνουμε πχ. για να είναι τοξικό το δείγμα μπορεί να περιέχει βαρέα μέταλλα ή φυτοφάρμακα ή πετρελαιοειδή. Κοιτάμε από ποια περιοχή προήλθε το δείγμα και τι υπάρχει εκεί που μπορεί να κατέληξε μέσα στο δείγμα και το κάνει τοξικό.



Πχ. έστω ότι δείγμα ήρθε από περιοχή κοντά σε διυλιστήρια.

Τότε μπορεί να περιέχει βαρέα μέταλλα ή και πετρελαιοειδή. Έστω ότι ψάχνουμε πρώτα για βαρέα μέταλλα.

<u>Ποια είναι τα βαρέα μέταλλα</u>? Ποια γνωρίζετε?

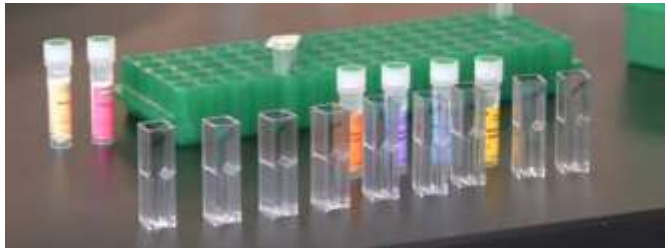
<u>Απάντηση:</u> κάδμιο, υδράργυρος, μόλυβδος, (από τα πιο επικίνδυνα), επίσης χρώμιο, κοβάλτιο, νικέλιο, χαλκός, ψευδάργυρος κ.α.

<u>Πώς μπορούμε να τα μετρήσουμε σε ένα δείγμα?</u>

<u>Απάντηση:</u> χρειαζόμαστε το κατάλληλο αναλυτικό όργανο πχ. Φασματόμετρο Ατομικής Απορρόφησης (άρα και τα χρήματα για να το αγοράσουμε της τάξης 50 χιλ. €)

Επίσης πρέπει να κάνουμε προετοιμασία στο δείγμα: να το περάσουμε από φιλτράκι με πολύ μικρούς πόρους ώστε να μην υπάρχουν καθόλου σωματίδια μέσα στο δείγμα (θα βουλώσουν τα σωληνάκια του οργάνου) και να το επεξεργαστούμε με πυκνά οξέα για είναι σίγουρα διαλυτά τα μέταλλα.

Δηλ. αυτό ο τρόπος χρειάζεται χρόνο και χρήμα!



Όμως υπάρχει και άλλος τρόπος να απαντήσουμε εάν ένα υγρό δείγμα είναι τοξικό: <u>τα τεστ τοξικότητας</u>, απλά γρήγορα και φθηνά!

Σε ένα τέτοιο τεστ τοξικότητας αναφέρεται στο σημερινό εργαστήριο.

Γενικά Θεωρία

Οικοτοξικολογικές αναλύσεις

Προσδιορισμός της *επίδρασης ενός αγνώστου δείγματος* στην επιβίωση ή στο ρυθμό ανάπτυξης ζωντανών οργανισμών

Δηλ. Προσδιορίζουμε:

Το ποσοστό θνησιμότητας ή το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης ενός ζωντανού οργανισμού

ή

Της συγκέντρωσης (LC_{50}) που προκαλεί 50 % θνησιμότητα ή αναστολή στην ανάπτυξη ενός ζωντανού οργανισμού

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Δύο διαφορετικές επιστήμες!

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ:
Επίδραση των φαρμακευτικών ουσιών, των ρύπων και της τροφής στην <u>ανθρώπινη</u> υγεία

ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ:
Επίδραση των χημικών, των ρύπων, των αποβλήτων…σε <u>οργανισμούς του οικοσυστήματος</u>

<u>Παραδείγματα Μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στις οικοτοξικολογικές αναλύσεις:</u>

(α)

(β)

Φωτογραφίες των υδρόβιων οργανισμών

(α) Artemia salina και *(β) Daphnia magna*

Λίγο από Θεωρία…

Τοξική ουσία…….οποαδήποτε ουσία προκαλεί προκαλεί βλάβη υγείας ή θάνατο όταν με οποιοδήποτε τρόπο εισέλθει σε ζώντα οργανισμό

Τοξικότητα…….. εκφράζει το βαθμό πρόκλησης αρνητικών επιπτώσεων στο βιολογικό σύστημα ενός οργανισμού, εξαιτίας μιας χημικής ουσίας.

Ευρωπαϊκή Ένωση (οδηγία 60/2000) για ποιότητα επιφανειακών νερών: πέρα από τις χημικές αναλύσεις και προσδιορισμός της οικολογικής ποιότητας των επιφανειακών νερών με την εφαρμογή των τεστ τοξικότητας με τη χρήση υδρόβιων οργανισμών όπως τα οστρακόδερμα Artemia, τα βακτήρια, τα άλγη κλπ.

Γιατί??

ΑΠ: για να εξασφαλίσουμε ότι δεν υπάρχει τίποτα μέσα στο δείγμα που να προκαλεί τοξικότητα και που δεν ελέχθηκε με τις αναλύσεις ρουτίνας (που είναι συγκεκριμένες και όχι άπειρες).

Εκτίμηση Τοξικότητας Υγρών Δειγμάτων- Δείκτης τοξικότητας

Θανατηφόρα Συγκέντρωση **LC_{50}** (**L**ethal **C**oncentration)

Συγκέντρωση (για υγρά δείγματα) της επικίνδυνης ουσίας προκαλεί θάνατο στο 50% πειραματόζωων.

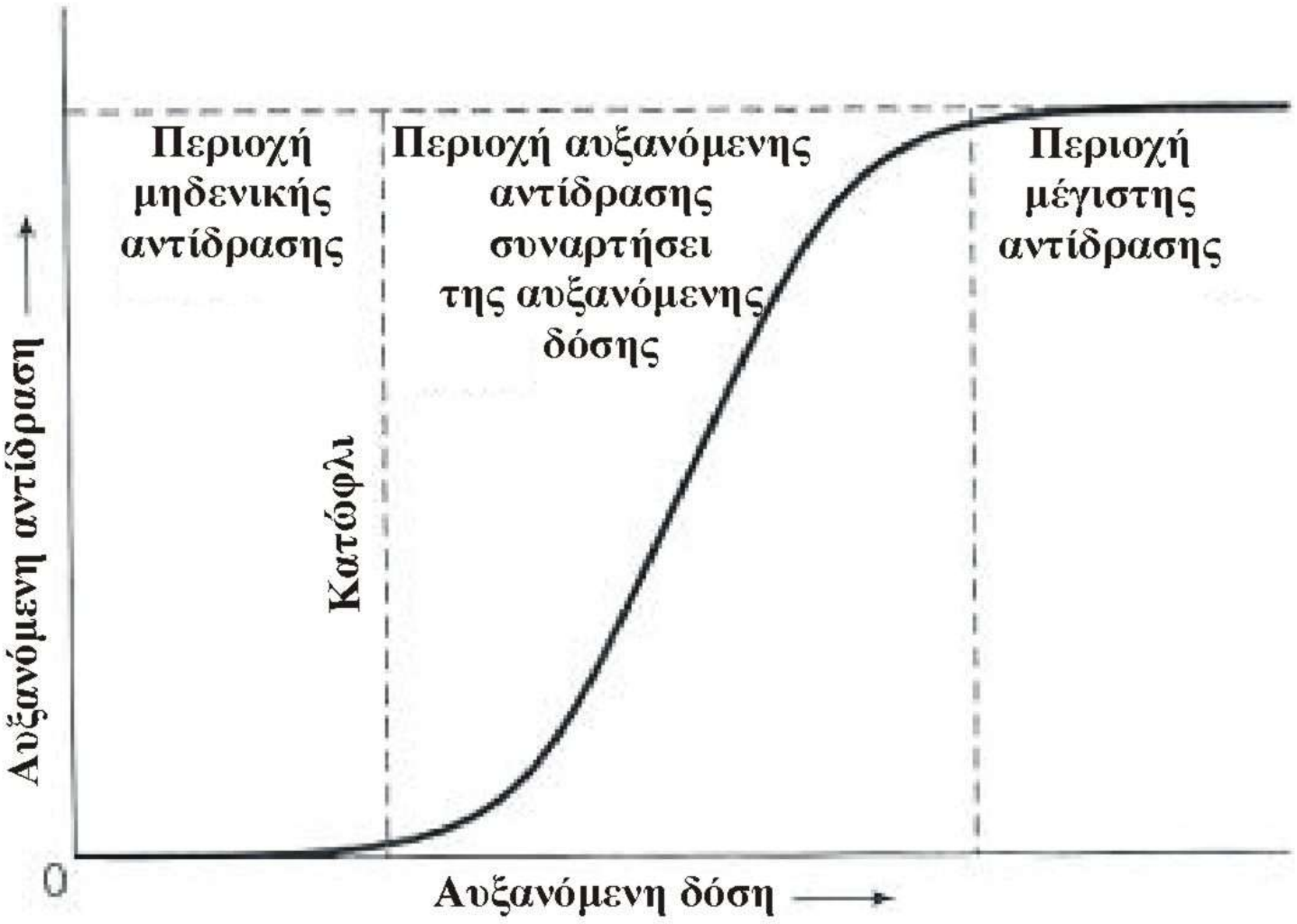
Θανατηφόρα Δόση **LD_{50}** (**L**ethal **D**ose)

Δόση (ποσότητα, για στερεά δείγματα) της επικίνδυνης ουσίας προκαλεί θάνατο στο 50% των πειραματόζωων.

Οριακή Τιμή Έκθεσης-Κατωφλιού **TLV** (**T**hreshold **L**imit **V**alue) μέγιστη **συγκέντρωση** της ουσίας στην οποία θα μπορούσε να εκτίθεται ένας συγκεκριμένος οργανισμός κάθε ημέρα χωρίς σημαντική βλάβη

Μορφή Διαγράμματος Δόσης- Αντίδρασης

Συνήθως η αντίδραση (στον άξονα y) είναι % Θνησιμότητα.



Όταν έχουμε αυτή τη σιγμοειδή καμπύλη, ο άξονας χ είναι **λογάριθμος** της Συγκέντρωσης/Δόσης

Στο διάγραμμα μας ενδιαφέρει

Η **τιμή κατώφλι**

Η τιμή Δόσης/συγκέντρωσης που προκαλεί **50% αντίδραση (πχ. θνησιμότητα)**

και η τιμή προκαλεί **100% αντίδραση (πχ. θνησιμότητα).**

- Το διάγραμμα ισχύει για όλες τις τοξικές ουσίες. Πχ μια τοξική ουσία που όλοι έχουμε εκτεθεί είναι η αιθυλική αλκοόλη δηλ. αλκοόλ.

Ποια είναι η τιμή κατώφλι??

Για τα παιδιά η λήψη: 1ML/Kgr Προκαλεί σοβαρή δηλητηρίαση

Ο ορισμός της «υπεύθυνης» ή κατανάλωσης χαμηλού κινδύνου σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας είναι:

Οι **γυναίκες** να μην καταναλώνετε περισσότερες από **δύο (2) μονάδες αλκοόλ την ημέρα (ΤΙΜΗ ΚΑΤΩΦΛΙ)**
Οι **άνδρες** να μην καταναλώνετε περισσότερες από **τρεις (3) μονάδες αλκοόλ την ημέρα (ΤΙΜΗ ΚΑΤΩΦΛΙ)**

Να μην ξεπερνάτε τις τέσσερις (4) μονάδες αλκοόλ σε καμία περίπτωση

Υπάρχει τιμή προκαλεί 100% αντίδραση (πχ. 100% θνησιμότητα) από αλκοόλ??
Για οξεία τοξικότητα (όχι χρόνια)

ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΣ ΔΟΣΗ ΑΠΟ ΑΙΘΥΛΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ

- *Για ενήλικα μέσου βάρους: 300-400ml καθαρού οινοπνεύματος τα οποία λαμβάνονται σε χρονικό διάστημα λιγότερο από μια ώρα.*

Για τα παιδιά η λήψη: 1ML/Kgr Προκαλεί σοβαρή δηλητηρίαση

Πειραματικό μέρος

<u>Χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού:</u>

τεστ οξείας τοξικότητας- Artemia Salina

χρησιμοποιούνται τα "νεογνά" Artemia Salina (<*ηλικίας 24h*) που εκκολάπτονται σε περίπου 24 ώρες (στους 28° C) από τα αυγά - εφίππια.

Δείτε αρτεμια ζωντανα: https://www.youtube.com/watch?v=O3AgBocZnDc στο 2:50

https://www.youtube.com/watch?v=1HR258JgzNk (εδώ είναι αρκετα μεγαλα σε μέγεθος, δεν είναι νεογνά)

1. **Το υγρό που μας δίνεται το θεωρούμε συγκέντρωση 100% (διάλυμα Α) και κατασκευάζουμε αραιώσεις από αυτό.**
2. **Θα εξετάσουμε το διάλυμα 100% και τις αραιώσεις του.**
3. **Δημιουργία διαλυμάτων αραίωσης τοξικού αποβλήτου:**

Κατασκευάστε 3 δ/τα (**Β: 12.5%, Γ: 25%, Δ: 50%**) όγκου 10ml το καθένα από **το διάλυμα 100%**

Διάλυμα **Α**: 50ml άγνωστο (100%).

Β, Γ, Δ:, (**Β: 12.5%, Γ: 25%, Δ: 50%**) κ.ο. του δ/τος Α (αραίωση με θαλασσινό νερό αντί για απιονισμένο επειδή τα Artemia ζουν σε θαλασσινό νερό)

Πώς κατασκευάζω τα διαλύματα?

Χρησιμοποιώ τον νόμο της αραίωσης.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$100\% * V_1 \text{ ml} = C_2 * 10 \text{ ml}$$

Το C2 είναι αρχικά το 12,5%

Το V_1 είναι ο άγνωστος

Βρίσκω V_1 =1,25 ml

Μετά υπολογίζω για C2 =25% Βρίσκω V_1 =2,5 ml

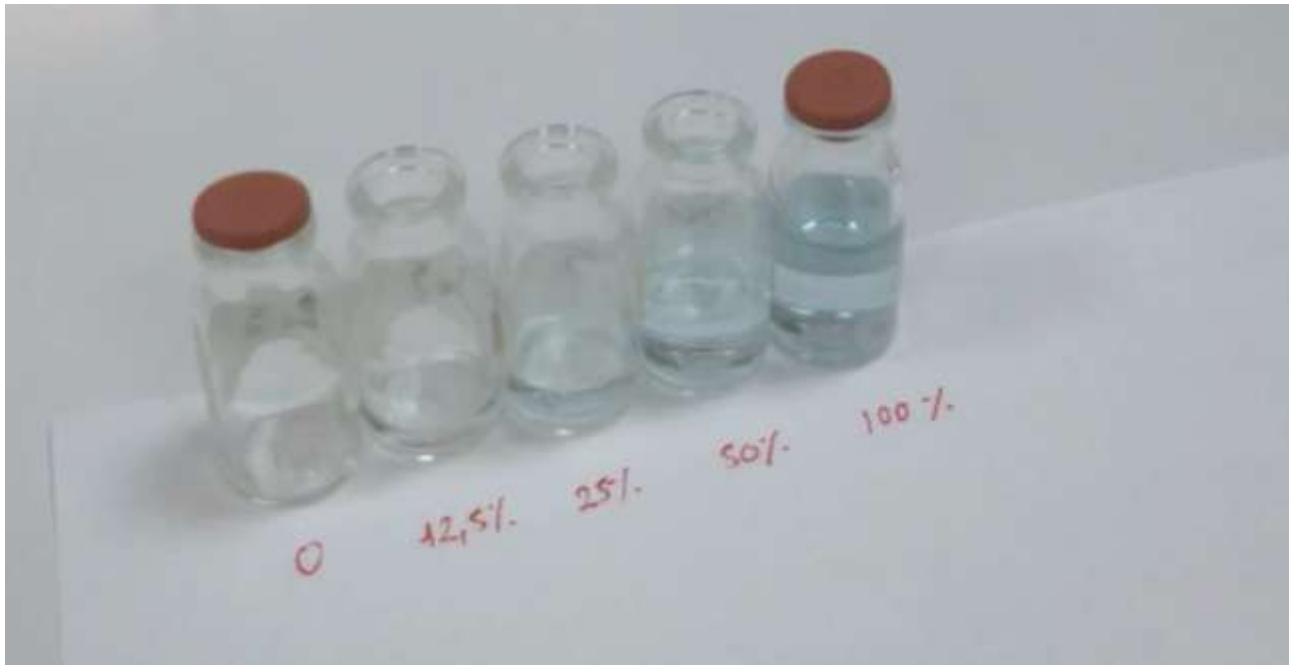
Μετά υπολογίζω για C2 =50% Βρίσκω V_1 =5 ml

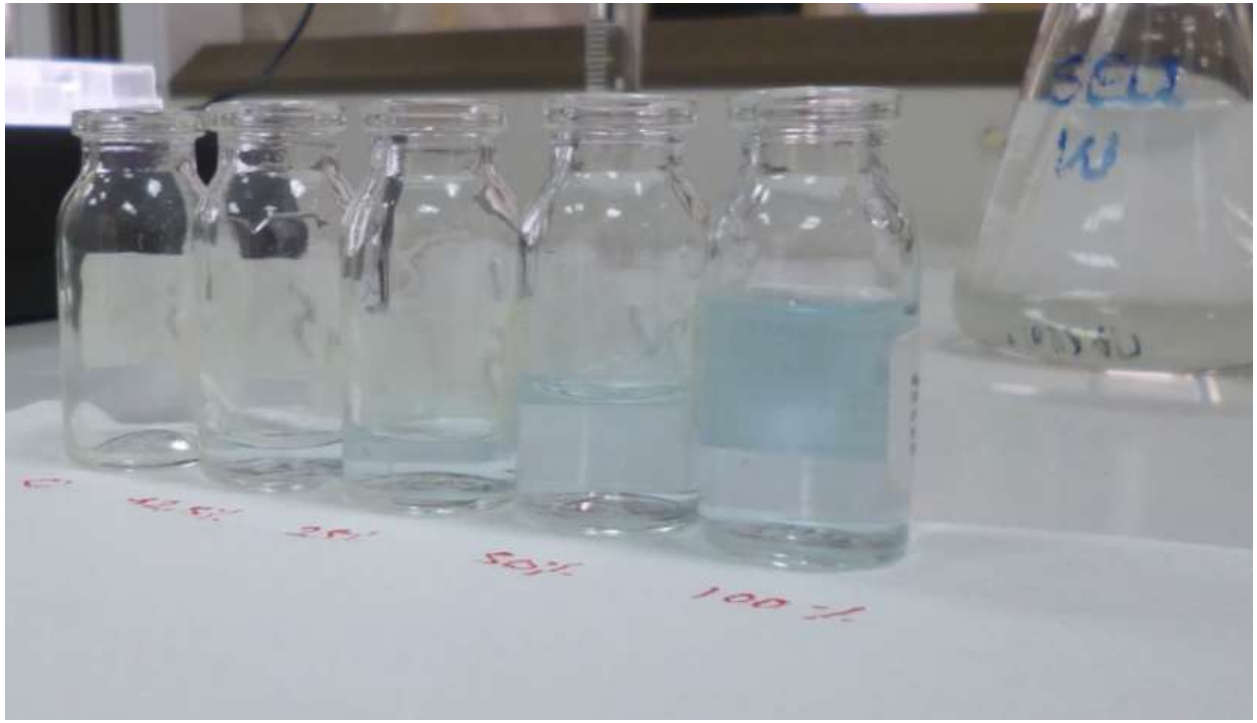
Βήματα

1. Βάλτε σε ογκομετρικό κύλινδρο το σωστό όγκο στραγγισμάτων (πχ. V1 =1,25 ml) από το δ/μα 100%.
2. Συμπληρώστε με θαλασσινό νερό έως 10ml
3. Βάλτε το διάλυμα σε κωνική φιάλη / άλλο δοχείο

4. Ξεκινήστε με τη χαμηλότερη συγκέντρωση πρώτα, τελευταία η μεγαλύτερη συγκέντρωση (γιατί?)

   Απ: όταν δουλεύω από το αραιότερο προς το πυκνότερο μπορώ να χρησιμοποιώ τα ίδια σκευη, χωρις ενδιάμεσα να τα πλύνω και χωρίς μεγάλο λάθος.


0
12,5%
25%
50%
100 %


0
12,5%
25%
50%
100 %

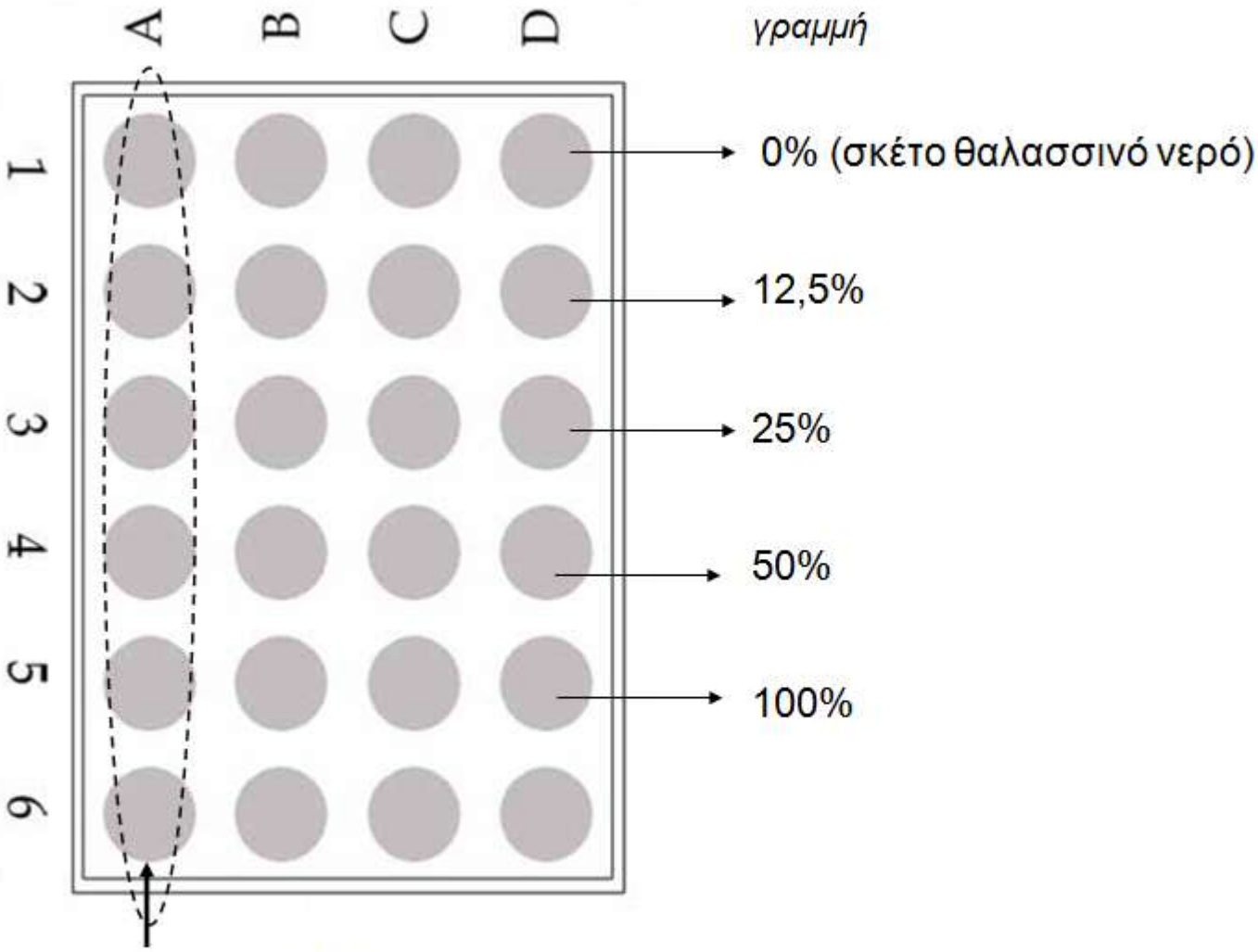
Για το τεστ πρεπει να γεμίσω αυτές τις κυψελίδες.

Σε κάθε <u>οριζόντια</u> γραμμή γεμίζω με άλλη συγκέντρωση %.

Δουλεύω οριζόντια.

Πλήρωση των κυψελίδων:

συγκεντρώσεις τοξικής ουσίας ανά οριζόντια γραμμή

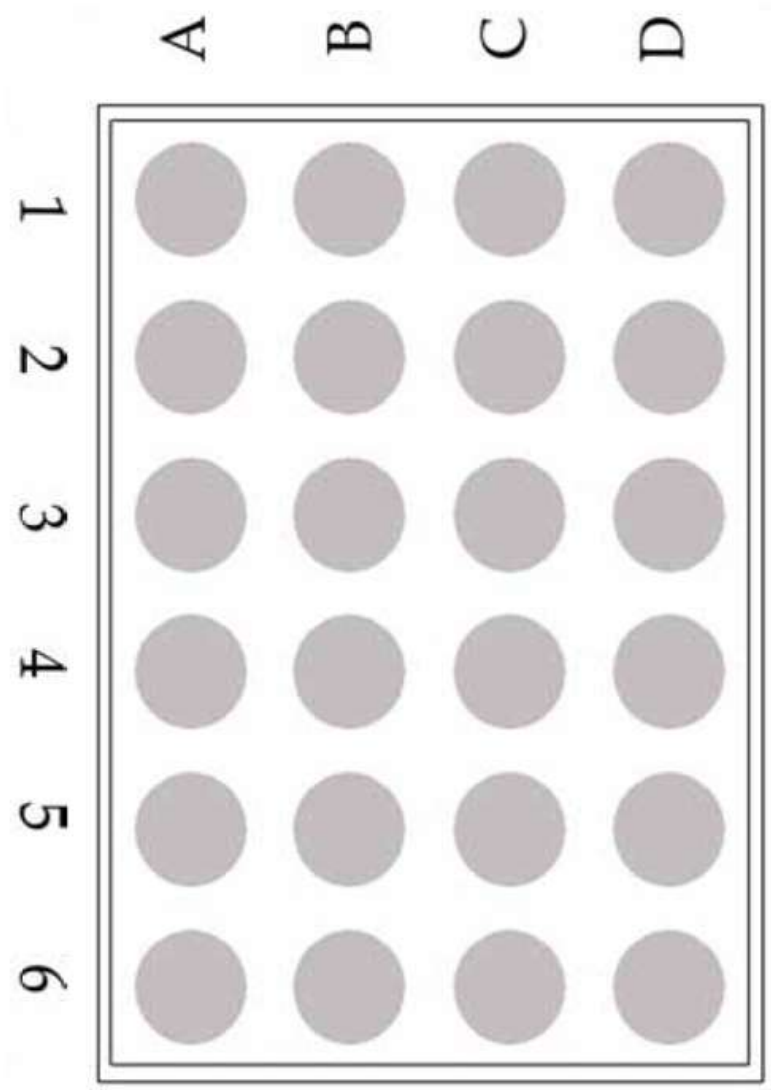


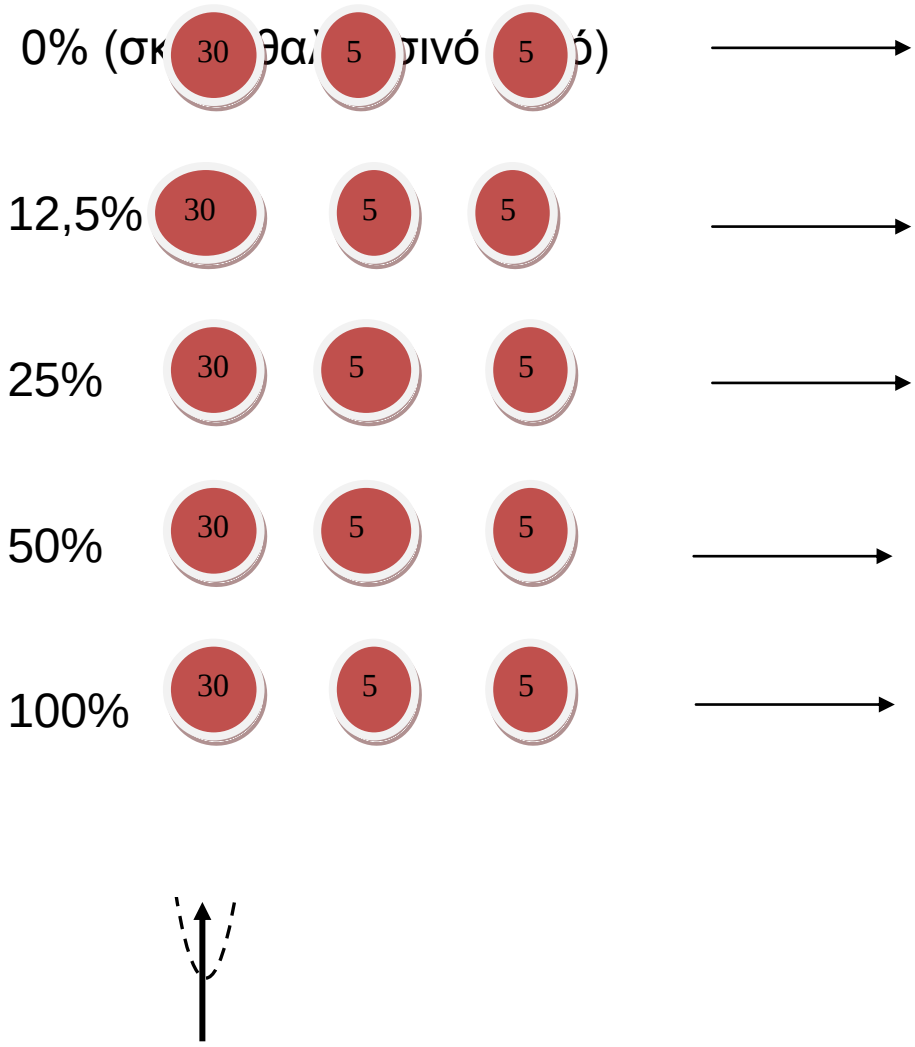
Τοποθετείστε με σιφώνιο 2ml κάθε δ/τος σε κάθε κυψελίδα (οπή) μιας συγκεκριμένης γραμμής (και στις κυψελίδες αποθήκευσης-1η στήλη).

Σκοπός των κυψελίδων της πρώτης στήλης είναι να γίνει η μεταφορά των νεογνών αρχικά σε αυτές και μετά στις κυψελίδες δοκιμής –γιατί?

Συνολικά θα γεμίσουμε την πρώτη στήλη A και τις στήλες B και C, που είναι για επαναλήψεις. Θα κάνουμε 2 επαναλήψεις. Την στήλη D που είναι για 3η επαναληψη δεν θα τη χρησιμοποιήσουμε. Θα έχουμε μόνο 2 επαναλήψεις.
Συνολικά θα γεμίσουμε όλες τις κυψελίδες με κόκκινο χρώμα.
Αφήνουμε την τελευταία οριζόντια γραμμή (6η) και την τελευταία στήλη D.

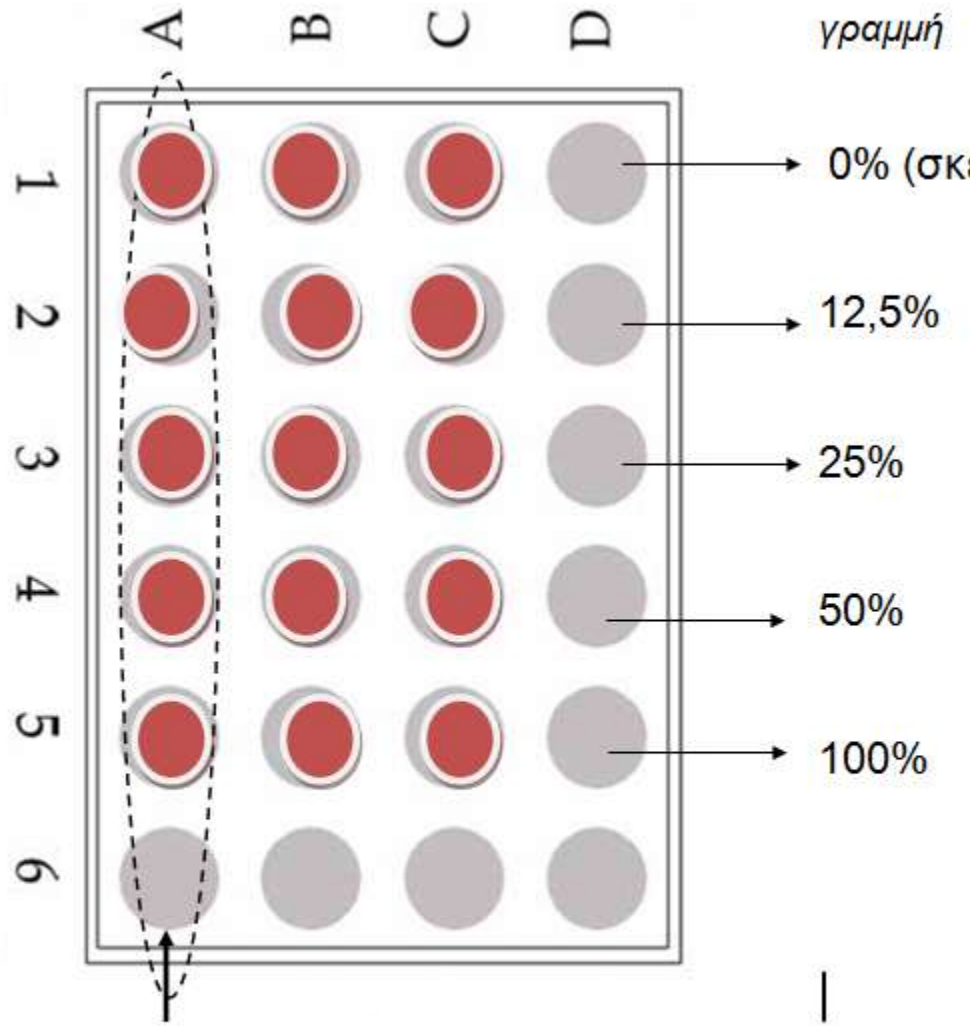
συγκεντρώσεις τοξικής ουσίας ανά οριζόντια γραμμή





χώρος αποθήκευσης νεογνών – κυψελίδες αποθήκευσης

LIGHTBOX
MODEL GRANDE



συγκεντρώσεις τοξικής ουσίας ανά οριζόντια γραμμή

0% (σκέτο θαλασσινό νερό)

12,5%

25%

50%

100%

χώρος αποθήκευσης νεογνών – κυψελίδες αποθήκευσης

Control row

Control row=οριζόντια γραμμή με 0% τοξική ουσία δηλ. σκέτο θαλασσινό νερό. (Είναι η γραμμή ελέγχου αφού εδώ πρέπει να ζήσουν τα Artemia)

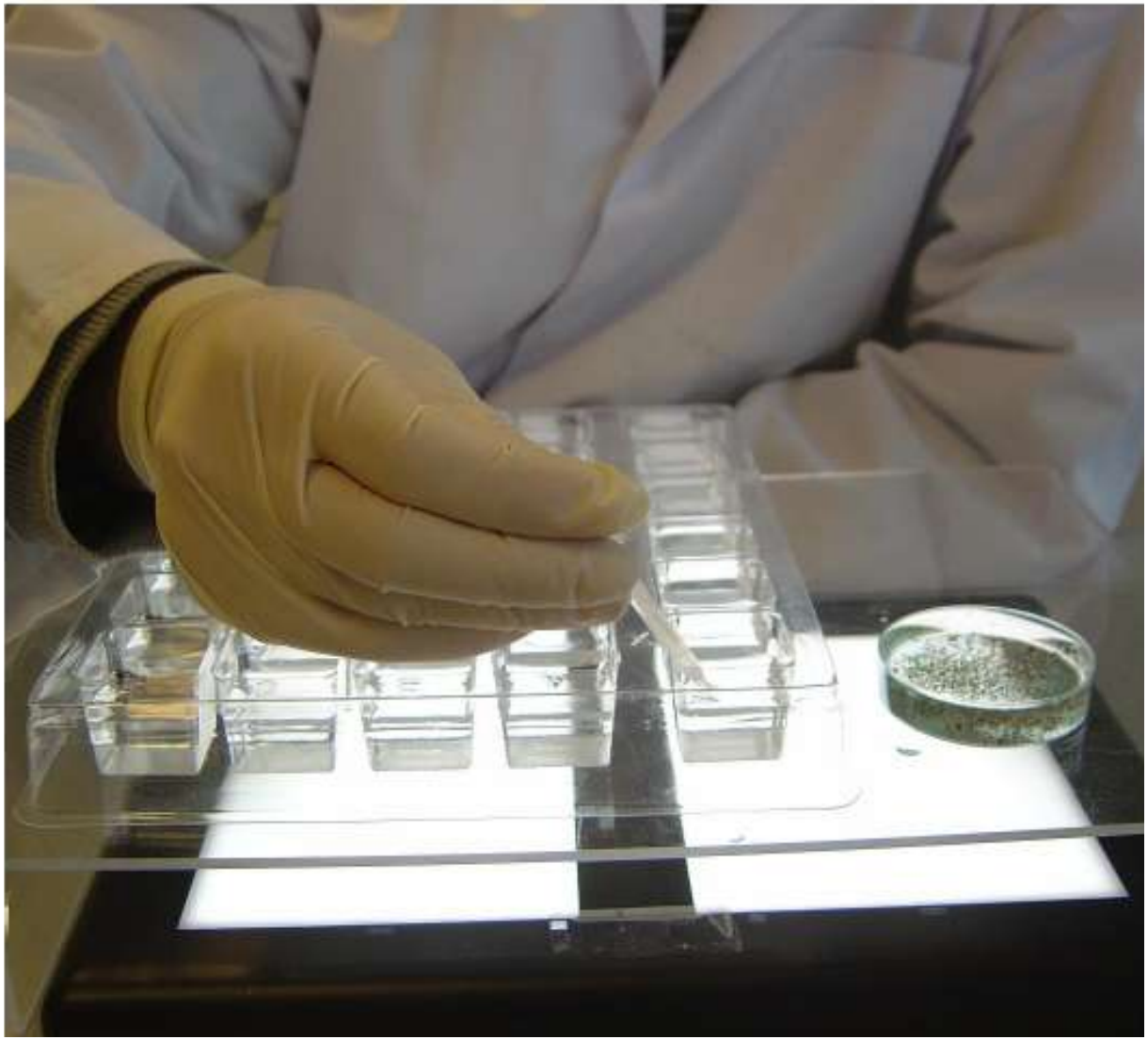
1. **Μεταφορά των νεογνών στις κυψελίδες δοκιμής:**

Τοποθετείστε το *δισκίο επώασης* των Artemia

στη φωτιζόμενη πλάκα και μεταφέρετε 30-35 (κολυμπώντας ενεργά) νεογνά με μικροσιφώνια στις κυψελίδες αποθήκευσης (δεν μας ενδιαφέρει ακριβώς ο αριθμός στην πρώτη στήλης αρκεί να μπουν πολλά Artemia)

Δείτε αρτεμια ζωντανα: https://www.youtube.com/watch?v=O3AgBocZnDc στο 2:50

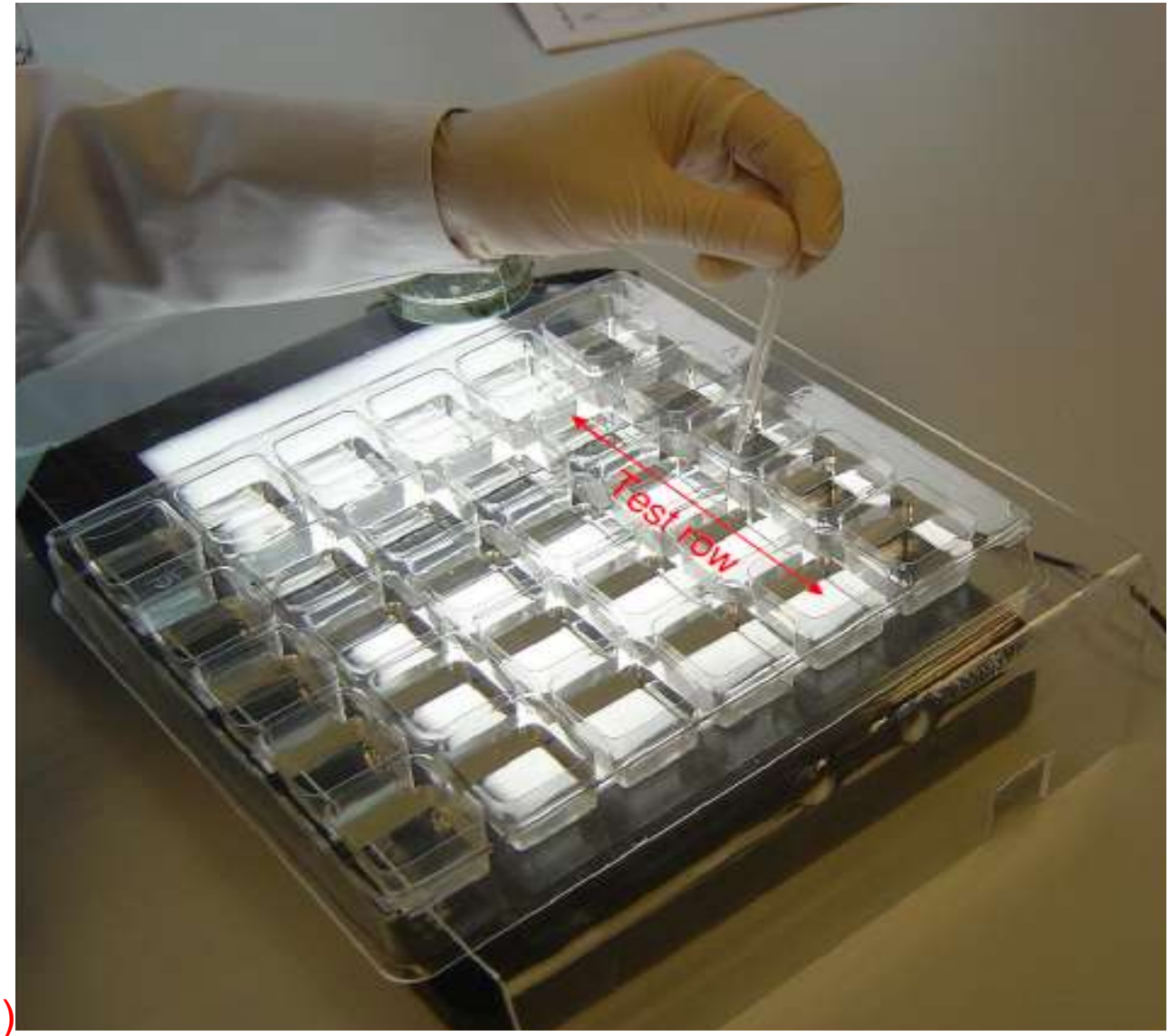
https://www.youtube.com/watch?v=1HR258JgzNk (εδώ είναι αρκετα μεγαλα σε μέγεθος, δεν είναι νεογνά)



ΠΡΟΣΟΧΗ!!!

Απελευθερώνουμε τα *Artemia* κάτω από το νερό και όχι στην επιφάνεια-παγίδευση και θάνατος από επιφανειακή τάση

τοποθετείστε το πιάτο με τις κυψελίδες πάνω στην φωτιζόμενη πλάκα και μεταφέρετε από την κάθε κυψελίδα αποθήκευσης (1 στήλη) 5 νεογνά σε καθεμία από τις 3 κυψελίδες της ίδιας οριζοντιας γραμμής –βάλτε 1-2 νεογνά στην 1η κυψελίδα, 1-2 στη 2η κοκ μέχρι 5 νεογνά-

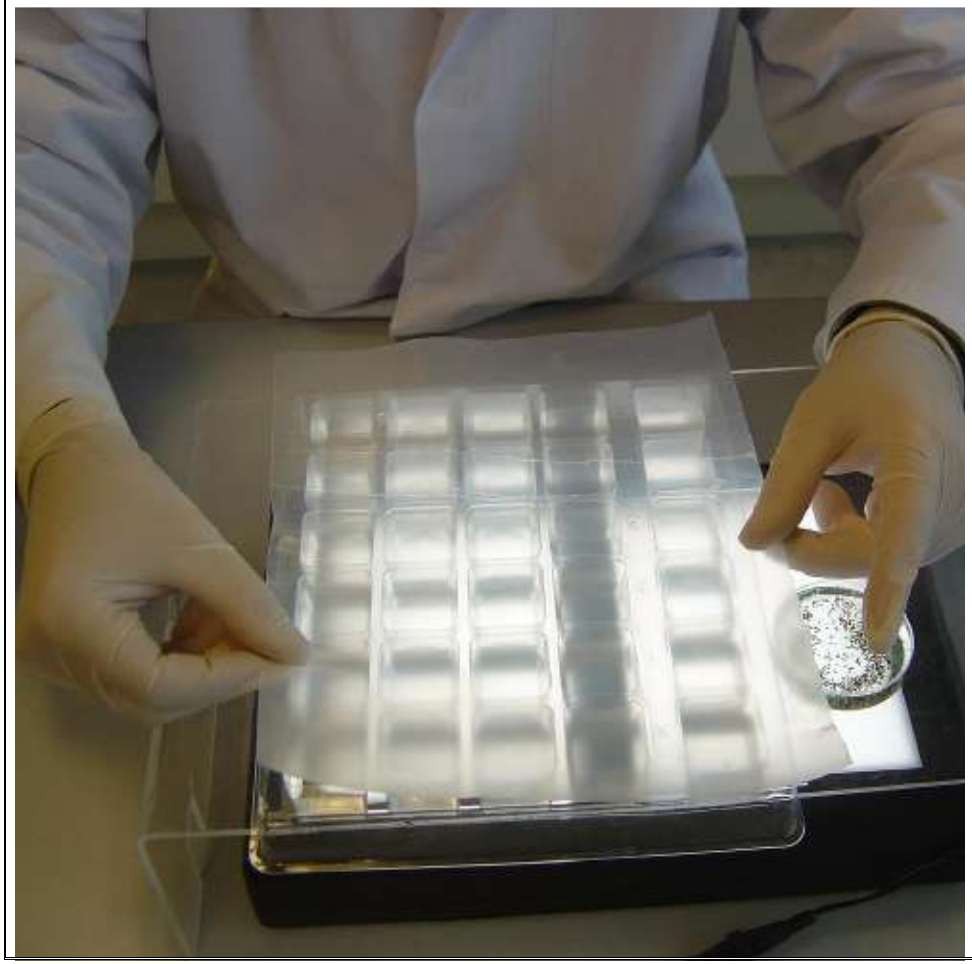


(τυχαία κατανομή)

Όταν τελειώσουμε και έχουμε βάλει παντού τον ίδιο αριθμό Αρτεμια (πχ. 5)

2. Επώαση των νεογνών εντός των κυψελίδων και σημείωση των αποτελεσμάτων:

Τοποθετείστε ένα φύλλο Parafilm πάνω από το πιάτο των κυψελίδων



και βάλτε τα νεογνά να επωαστούν στους 25°C, στο σκοτάδι.

Μετά από 24h επώασης, τοποθετήστε το πιάτο με τις κυψελίδες πάνω στη φωτιζόμενη πλάκα και μετρήστε τον αριθμό των νεκρών και ακινητοποιημένων* οργανισμών στις κυψελίδες δοκιμής και στις κυψελίδες των διαλυμάτων Α έως Δ.

Για να είναι αποδεκτό το τεστ θα πρέπει στα κελιά αναφοράς(0% τοξική ουσία, 1η οριζόντια γραμμή) το ποσοστό θνησιμότητας να είναι <10%

Επεξεργασία μετρήσεων

Στο e-class υπάρχουν μετρήσεις για όλες τις ομάδες δηλ. αριθμός ζωντανών Αρτεμια/αριθμός αρτεμια που μπήκαν αρχικά σε κάθε μία από τις 2 επαναλήψεις.

Πχ.

Συγκεντρ.%	στήλη επανάληψης (αριθμός ζωντανών σε σύνολο 6 ανά κυψελίδα)	
0	6	5
12.5	5	5
25	4	4
50	3	1
100	0	1

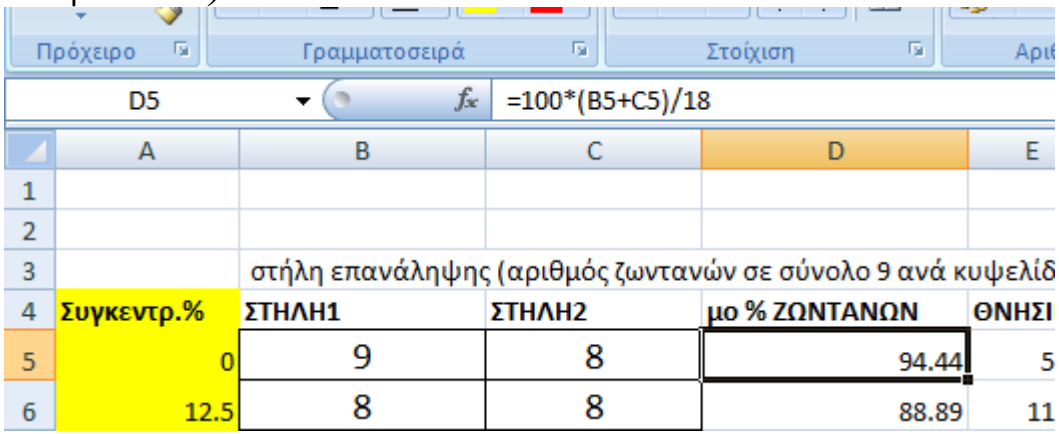
Επεξεργασία:

Εάν υπάρχει <10% θάνατος στην πρώτη οριζόντια γραμμή (0%) είναι αποδεκτό και είναι θάνατος που οφείλεται σε τυχαία αίτια, όχι στην τοξική ουσία αφού η συγκ. τοξικής ουσίας στην πρώτη γραμμή είναι 0%.

Για να βρούμε τη θνησιμότητα που οφείλεται μόνο στην τοξική ουσία το ποσοστό θανάτωσης της πρώτης γραμμής θα αφαιρεθεί από παντού και έτσι θα έχουμε διορθωμένη θνησιμότητα που οφείλεται μόνο στην τοξική ουσία. Πχ.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1										
2										
3		στήλη επανάληψης (αριθμός ζωντανών σε σύνολο 9 ανά κυψελίδα)								
4	**Συγκεντρ.%**	**ΣΤΗΛΗ1**	**ΣΤΗΛΗ2**	**μο % ΖΩΝΤΑΝΩΝ**	**ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ%**		**ΔΙΟΡΘΩΜΕΝΗ %ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ**			
5	0	9	8	94.44	5.56		0.00			
6	12.5	8	8	88.89	11.11		5.56			
7	25	7	7	77.78	22.22		16.67			
8	50	6	4	55.56	44.44		38.89			
9	100	1	0	5.56	94.44		88.89			
10										
11										

Όπου ο % μέσος όρος ζωντανών (για 18 συνολικό αριθμό αρτεμια, αφού εχω 9 ανα κυψελίδα)



ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ%

E5 =100-D5

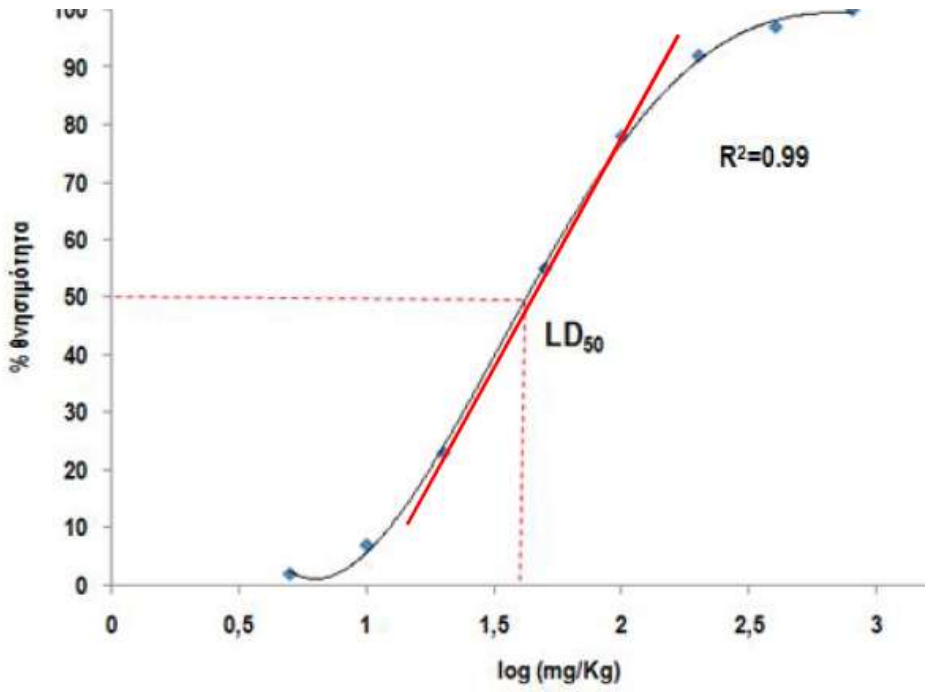
	A	B	C	D	E	F	G
1							
2							
3		στήλη επανάληψης (αριθμός ζωντανών σε σύνολο 9 ανά κυψελίδα)					
4	Συγκεντρ.%	ΣΤΗΛΗ1	ΣΤΗΛΗ2	μο % ΖΩΝΤΑΝΩΝ	ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ%		ΔΙΟΡΘΩΜΕΙ
5	0	9	8	94.44	5.56		0.00
6	12.5	8	8	88.89	11.11		5.56
7	25	7	7	77.78	22.22		16.67
8	50	6	4	55.56	44.44		38.89

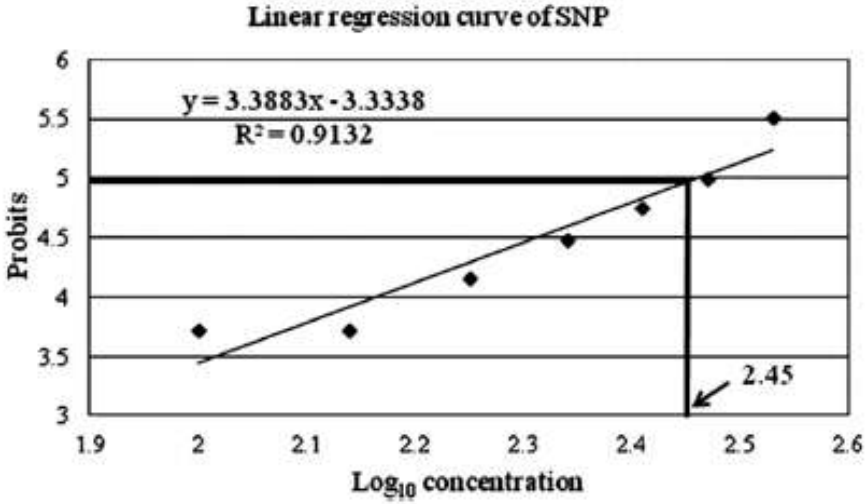
ΔΙΟΡΘΩΜΕΝΗ %ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

G6 =E6-E5

	A	B	C	D	E	F	G
1							
2							
3		στήλη επανάληψης (αριθμός ζωντανών σε σύνολο 9 ανά κυψελίδα)					
4	Συγκεντρ.%	ΣΤΗΛΗ1	ΣΤΗΛΗ2	μο % ΖΩΝΤΑΝΩΝ	ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ%		ΔΙΟΡΘΩΜΕΝΗ
5	0	9	8	94.44	5.56		0.00
6	12.5	8	8	88.89	11.11		5.56
7	25	7	7	77.78	22.22		16.67
8	50	6	4	55.56	44.44		38.89
9	100	1	0	5.56	94.44		88.89

Δουλεύω με τις 2 κιτρινισμένες στήλες από δω και πέρα A, G





$C=10^{2.45}$

Για μετασχηματισμό σε μονάδες probit σας δίνονται 2 πίνακες στα αρχεία εργαστηρίου, πχ.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	–	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.60	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.30	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
–	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	08	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Appendix A Table 2. Transformation of percentages to probits.

%	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
0	—	1.9098	2.1218	2.2522	2.3479	2.4242	2.4879	2.5427	2.5911	2.6344
1	2.6737	2.7096	2.7429	2.7738	2.8027	2.8299	2.8556	2.8799	2.9031	2.9251
2	2.9463	2.9665	2.9859	3.0046	3.0226	3.0400	3.0569	3.0732	3.0890	3.1043
3	3.1192	3.1337	3.1478	3.1616	3.1750	3.1881	3.2009	3.2134	3.2256	3.2376
4	3.2493	3.2608	3.2721	3.2831	3.2940	3.3046	3.3151	3.3253	3.3354	3.3454
5	3.3551	3.3648	3.3742	3.3836	3.3928	3.4018	3.4107	3.4195	3.4282	3.4368
6	3.4452	3.4536	3.4618	3.4699	3.4780	3.4859	3.4937	3.5015	3.5091	3.5167
7	3.5242	3.5316	3.5389	3.5462	3.5534	3.5605	3.5675	3.5745	3.5813	3.5882
8	3.5949	3.6016	3.6083	3.6148	3.6213	3.6278	3.6342	3.6405	3.6468	3.6531
9	3.6592	3.6654	3.6715	3.6775	3.6835	3.6894	3.6953	3.7012	3.7070	3.7127
10	3.7184	3.7241	3.7298	3.7354	3.7409	3.7464	3.7519	3.7574	3.7628	3.7681
11	3.7735	3.7788	3.7840	3.7893	3.7945	3.7996	3.8048	3.8099	3.8150	3.8200
12	3.8250	3.8300	3.8350	3.8399	3.8448	3.8497	3.8545	3.8593	3.8641	3.8689
13	3.8736	3.8783	3.8830	3.8877	3.8923	3.8969	3.9015	3.9061	3.9107	3.9152
14	3.9197	3.9242	3.9286	3.9331	3.9375	3.9419	3.9463	3.9506	3.9550	3.9593
15	3.9636	3.9678	3.9721	3.9763	3.9806	3.9848	3.9890	3.9931	3.9973	4.0014
16	4.0055	4.0096	4.0137	4.0178	4.0218	4.0259	4.0299	4.0339	4.0379	4.0419
17	4.0458	4.0498	4.0537	4.0576	4.0615	4.0654	4.0693	4.0731	4.0770	4.0808
18	4.0846	4.0884	4.0922	4.0960	4.0998	4.1035	4.1073	4.1110	4.1147	4.1184
19	4.1221	4.1258	4.1295	4.1331	4.1367	4.1404	4.1440	4.1476	4.1512	4.1548
20	4.1584	4.1619	4.1655	4.1690	4.1726	4.1761	4.1796	4.1831	4.1866	4.1901
21	4.1936	4.1970	4.2005	4.2039	4.2074	4.2108	4.2142	4.2176	4.2210	4.2244
22	4.2278	4.2312	4.2345	4.2379	4.2412	4.2446	4.2479	4.2512	4.2546	4.2579
23	4.2612	4.2644	4.2677	4.2710	4.2743	4.2775	4.2808	4.2840	4.2872	4.2905
24	4.2937	4.2969	4.3001	4.3033	4.3065	4.3097	4.3129	4.3160	4.3192	4.3224
25	4.3255	4.3287	4.3318	4.3349	4.3380	4.3412	4.3443	4.3474	4.3505	4.3536

Source: manual for testing insecticides on rice.