

Statistické otazníky řasových biotestů

Statistical questionmarks of the algal bioassays

Vladimír K o č í

Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT, Technická 5, CZ – 160 00, Praha 6

Abstract

The article focuses on statistical evaluation of algal bioassays. Statistical determination of EC50 and determination of low effect concentration is a very important part of presentation of ecotoxicological experiments. The question is, what is NOEC and LOEC in algal bioassay. The paper discusses the question how large difference between the sample and control algal growth should be considered as important. How large differences of algal growth in comparison to control means there is no important difference?

Cílem tohoto sdělení je otevřít otázku, jak správně interpretovat výsledky řasových testů toxicity. I kvalitně provedený pokus se stává bezcenným, je-li neadekvátním způsobem statisticky vyhodnocen. Nedílnou součástí výzkumu jakéhokoliv druhu je i prezentace dosažených výsledků. Zejména u takových prací, kde je možné experimentální data vyhodnocovat několika, více či méně odlišnými statistickými přístupy, je volba metody a její zdůvodnění velmi důležité. K tomu, aby bylo možné výsledky biologických pokusů odpovídajícím způsobem publikovat a porovnávat mezi sebou, je třeba shodnout se nejen na podmínkách jejich provádění, ale i vyhodnocování.

Cílem při prezentování ekotoxikologických dat je

- ❖ vhodným způsobem popsat toxické účinky testované látky na organizmy
- ❖ uvést, jak se toxické účinky mění s koncentrací
- ❖ nabídnout takové údaje, aby bylo možné toxickou látku srovnat s jinými látkami
- ❖ uvést spolehlivost zveřejněných hodnot.

Otázka interpretace řasových biotestů je otevřená a s rozšiřujícím se užíváním řasových testů toxicity a trofie se stává důležitou i pro praxi (KOČÍ 2000a). Je-li naším úkolem popsat toxické účinky testovaných vzorků na růst řasové biomasy, musíme zvolit takovou interpretaci, aby zadavatel z obdržených dat byl schopen usoudit na míru toxicity vzorků a případně vzájemně srovnat větší množství vzorků. Příkladem může být třeba sanační firma, která si nechává

dělat rizikovou analýzu zemin před a po procesu remediace, atenuace. V tomto případě by bylo žádoucí prezentovat ekotoxikologická data s co největší mírou zjednodušení, ovšem při zachování co největšího obsahu informací (Kočí 2000b).

Popis toxických účinků v závislosti na koncentraci je klíčovou otázkou v ekotoxikologii. Z hlediska životního prostředí jsou důležité ty koncentrace, které se mohou reálně vyskytovat, a které působí na organizmy dlouhodobě. Jedná se o koncentrace relativně nízké, jejichž laboratorní testování je velmi komplikované. Se současným přístupem k experimentu také nemožné. V těchto nízkých koncentracích (odpovídajících např. EC 0,1 a méně) jsou intervaly spolehlivosti příliš široké. Lepší je používání NOEC (NOEC = no observed effect concentration = nejvyšší testovaná koncentrace látky, která nezpůsobuje statisticky významnou odchylku od kontroly). Nevýhodou při jejím určení je to, že nemáme zaručeno, zda jsme v testu nepoužili jedince odolnější než je průměr (o této problematice se zmiňuje MARVAN (1970). Zatím tedy není znám lepší a pro praxi použitelnější přístup k exaktnímu hodnocení toxických účinků než určovat EC50 (medián efektivní koncentrace, vypočtená koncentrace, při které poskytne ekotoxikologickou odpověď 50% organismů, za ekotoxikologickou odpověď u řas považujeme inhibici růstové rychlosti či integrálního nárůstu biomasy). V tomto bodě má křivka závislosti ekotoxikologické odezvy na koncentraci testované látky inflexní bod a lze jej relativně přesně stanovit.

Experimentální určení hodnoty EC50 je vždy zatíženo chybou, o to důsledněji je třeba uvádět intervaly spolehlivosti. Bez intervalů (obvykle na hladině významnosti 95%) není možné si udělat představu o výpovědní hodnotě zjištěné EC50. Stejně důležité při publikování výsledků je uvádět jakým způsobem byla EC50 vypočtena a jaký aproximativní model se pro experimentální data hodí. To ovlivňuje nejen samotnou hodnotu EC50, ale i již zmíněné intervaly spolehlivosti. Při výběru regresní funkce je třeba vzít do úvahy nejen to, zda aproximativní funkce dobře prokládá naměřené hodnoty, ale zda také odpovídá reálným podmínkám závislosti účinku na koncentraci. Ne vždy musí úzký interval spolehlivosti EC50 dokazovat, že zvolený aproximativní model je vhodný pro hodnocení ekotoxikologického experimentu. Cílem volby regresní funkce by nemělo být získat co nejužší intervaly spolehlivosti, ale „správné“ intervaly spolehlivosti. Otevřenou otázkou zůstává, jak takové intervaly získat. V praxi často používaný postup použití polynomů vyšších stupňů nejenže nemusí odpovídat reálné závislosti účinku na koncentraci, ale rovněž poskytuje příliš úzké intervaly spolehlivosti. Zde jsme u jádra problému, jak hodnotit správnost vypočtené EC50. Úzký interval spolehlivosti říká, že aproximativní model dobře „sedí“ na experimentální hodnoty, nemusí však nic vypovídat o chybě experimentálních dat. Jsou-li k výsledným EC50 pokusů uváděny intervaly spolehlivosti bez bližší specifikace jejich určení, není opět možné vytvořit si představu o tom, jak vypočtená EC50 odpovídá reálným podmínkám. Celá tato otázka se týká

případu, kdy je EC50 určována ze závislosti účinku na koncentraci metodami jako je např. probitová, a ne z několika již vypočtených EC50.

Důležitým faktorem při posuzování toxických účinků látek je vedle EC50 i strmost křivky závislosti účinku na koncentraci. Dvě různé látky mající stejné EC50 nemusí být z hlediska ekotoxikologie stejně závažné, neboť jedna z nich může při nižších koncentracích být již neškodná, zatímco druhá může stále způsobovat úhyn značného množství organismů. Používání směrnice regresního modelu účinek-(log)koncentrace není vždy vhodné a ani se zatím neujalo. Vhodnějším parametrem se jeví poměr EC50/NOEC (GUILHERMINO et al. 1997). Stejně může sloužit i parametr EC50/LOEC (KOČÍ 1999, LOEC = low observed effect concentration = je v řadě vzestupných testovaných koncentrací bezprostředně vyšší koncentrace než je NOEC).

Praktický příklad

Praktické použití výše zmíněných koeficientů je uvedeno na následujícím příkladu srovnání toxických účinků dvou podobných látek. Šlo o srovnání toxického nebo naopak stimulujícího účinku fosforečnanové a zeolitické modifikace pracovního prostředí Colon. Pro testování byla použita řasa *Chlorella kessleri*. Jednalo se o dlouhodobý, chronický test (LUKAVSKÝ 1984, 1992) a byl očekáván výrazný rozdíl v působení na nárůst řasové biomasy. Původní představa o působení látek na řasy byla taková, že po prvotním stresu způsobeném toxickými účinky tenzidů a dalších biologicky rozložitelných látek, dojde k rychlému nárůstu řas ve vzorcích s fosforečnanovými prostředky. Ve vzorcích zeolitických detergentů byla očekávána další inhibice růstu v důsledku odčerpávání živin zeolitem.

Výsledky byly následující. Hodnoty koncentrací, kdy došlo k 50% inhibici růstové rychlosti (IC50) obou vzorků jsou srovnatelné. IC50/NOEC fosforečnanové modifikace je výrazně vyšší. To je způsobeno tím, že fosforečnanová modifikace způsobuje při nižších koncentracích stimulaci růstu. Důvodem, že ve fosforečnanové modifikaci řasy nezpůsobovaly podle očekávání ještě větší stimulaci růstu byl patrně fakt, že v roztocích řasám chyběly další látky nezbytné pro jejich růst. Bylo by proto dobré provést testování trofie s testy na limitní prvky tj. např. s přídávky P a N případně dalších živin. Lze předpokládat, že s přídatkem dusíku (případně dalších nutrientů) by fosforečnanový pracovní prostředek byl výrazně stimulující. To by odpovídalo i reálným podmínkám, kdy je v životním prostředí vlivem lidské činnosti dostatečné množství dusíku, jež je schopno pokrýt potřeby autotrofních organismů v případě jejich vyššího nárůstu způsobeného vyšší koncentrací fosforu. Toxické působení na řasy lze hodnotit podle IC50 obou forem pracích prostředků jako srovnatelné. Fosforečnanová modifikace způsobovala v nižších koncentracích nadměrnou stimulaci. Hodnota IC50/NOEC je u tohoto vzorku výrazně vyšší.

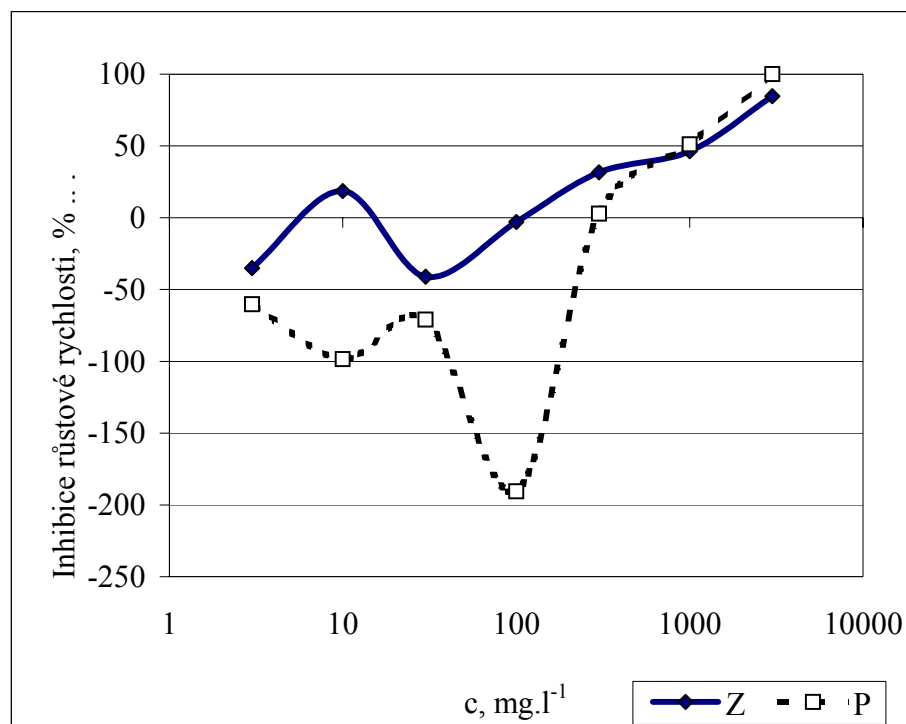
Tabulka 1: Srovnání toxických účinků zeolitického a fosforečnanového pracího prostředku Colon na řase zelenivce *Chlorella kessleri* (KOČÍ 2000A)

Table 1: Test on *Ch. kessleri* (detergent Colon with and without phosphates)

	Colon Z	Colon P
NOEC, mg.l⁻¹	100	30
LOEC, mg.l⁻¹	300	300
IC50, mg.l⁻¹	858	932
(interval spolehlivosti)	(560; 1393)	(829; 1044)
IC50/NOEC	8,58	31,06

Graf 1. Inhibice růstu řas, (P) Colon fosforečnanový, (Z) Colon zeolitický (KOČÍ 2000a)

Fig. 1: Growth inhibition by detergent Colon

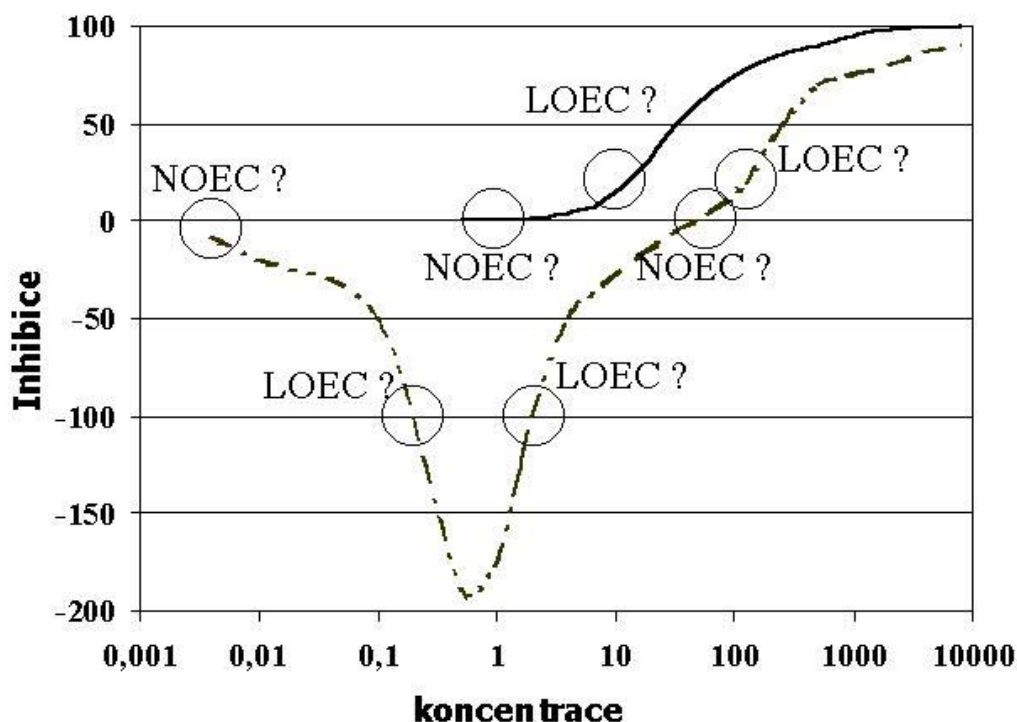


Při hodnocení toxických účinků látek na řasy (z průběhu křivky závislosti inhibice růstu na koncentraci) je však třeba zodpovědět si na otázku, co je

NOEC a následně LOEC. Je NOEC interval +30% až -30% inhibice růstu? Je za NOEC možné považovat i 100% stimulaci růstu?

Graf 2: Schematické znázornění, kde by na křivkách závislosti inhibice (stimulace = záporná inhibice) mohly být hledány hodnoty NOEC a LOEC.

Fig. 2: Possible positions of values NOEC and LOEC



Jednotka toxicity(TU)

Snaha zjednodušit hodnocení toxických účinků látek zavedením nových parametrů nemusí být vždy na místě. Příkladem je nově používaný parametr - jednotka toxicity TU (TU = Toxicity Unit, HOPKING 1990, MARŠÁLEK, ROJÍČKOVÁ 1995).

$$TU = 100(\text{mg.l}^{-1})/\text{EC}_{50}(\text{mg.l}^{-1})$$

Na první pohled by se mohlo zdát užití tohoto parametru praktické. Není tomu tak. V širokém používání takového parametru lze spatřovat určitý úbytek snahy prezentovat výsledky experimentů s co největší vypovídající hodnotou. TU se přesto začíná používat i v praxi. V příručce k testu Microtox® (ANONYM 1992) (str. 420) se TU doporučuje jako parametr, který svým vyšším číslem indikuje vyšší toxické účinky látky ve srovnání s EC₅₀, kde nižší koncentrace značí vyšší

toxicitu. To je zde považováno za klad, zejména kvůli přehlednosti pro pracovníky v praxi. Tento argument nelze považovat za adekvátní. Každý, kdo pracuje s ekotoxikologickými daty by měl být schopen vnímat nepřímou závislost míry toxicity a hodnoty EC50. Dále je TU doporučována jako prostředek ke srovnání toxických účinků dvou látek. V uvedeném příkladě návodu pro Microtox je konstatováno, že vzorek s TU 20 je dvakrát toxičtější než druhý s TU 10. To ovšem nelze na základě TU tvrdit. TU je vypočtená z EC50 a sama o sobě další informaci neposkytuje. Nelze tedy z parametru vypočteného z EC50 vyvozovat závěry o relativní toxicitě látek, k čemu např. ve zmíněné příručce došlo.

Chceme-li srovnat dvě toxické látky a konstatovat, že jedna z nich je x krát toxičtější, nemůžeme toto srovnání provést na základě hodnot EC50 a potažmo ani TU. K tomu je nutné provést test rovnoběžnosti křivek závislosti ekotoxikologické odezvy na koncentraci. V případě, že je předpoklad rovnoběžnosti splněn, lze vypočíst odhad relativní toxicity včetně jeho intervalů spolehlivosti (ROTH et.al. 1962). Tento postup je k dispozici již mnoho let v oblasti klinické toxikologie a pro zájemce je dobře dostupný.

Závěr

V ekotoxikologii zůstává řada otevřených otázek, mezi něž patří interpretace působení některých látek. Mnohé z nich způsobují při nižších koncentracích stimulaci růstu. To samozřejmě nelze do hodnoty IC50 zahrnout. Určení hodnoty NOEC je u řasových testů diskutabilní. Z hlediska toxikologie se jedná o hodnotu, která již nevykazuje inhibiční účinky, tj. hodnota inhibice klesla pod předem stanovenou mez. Takovou mez je však přesnější označit jako LOEC. Interval koncentrací mezi NOEC a LOEC může představovat nezanedbatelné stimulační účinky.

Pro kvalitní prezentaci naměřených ekotoxikologických dat doporučujeme uvádět vedle EC50 a intervalů spolehlivosti i metodu jejího výpočtu a parametry NOEC, LOEC, EC50/NOEC, případně EC50/LOEC. Tyto parametry se osvědčily jako vhodná doplňková hodnota EC50 pro porovnávání toxických účinků různých vzorků. Hodnot EC50 a hodnot z ní odvozených (TU) však nelze použít při srovnávání účinků látek v pojmech relativní toxicity.

Literatura

- ANONYM (1992): Microtox® Manual. Microbics Corporation.
- GUILHERMINO, L., DIAMANTINO, T.C., RIBEIRO, R., GONCALVES, F., & SOARES, A.M.V.M. (1997): Suitability of test media containing EDTA for the evaluation of acute metal toxicity to *Daphnia magna*. - *Ecotoxicology and environmental safety* 38: 292-295.
- HOPKING, S.P. (1990). Species-species differences in net assimilation of Zn, Cd, Pb, Cu, and Fe by terrestrial isotops. - *J. Appl. Ecol.* 27: 460-474.
- KOČÍ, V.(1999): Srovnání toxických účinků zeolitických a fosforečnanových pracích prostředků na vodní organizmy. – 106 pp., Ms., Doktorská disertační práce VŠCHT, Fakulta Technologie ochrany prostředí, Ústav technologie vody a prostředí, Praha.
- KOČÍ, V.(2000a): Statistické hodnocení řasových biotestů. – In: RULÍK, M. (ed.): Sborník přednášek XII. limnologické konference ČLS a SLS, Kouty nad Desnou, p.291-293.
- KOČÍ, V.(2000b): Prezentace výsledků ekotoxikologických dat. - ERA 2000, Brno, p. 165-168.
- LUKAVSKÝ, J. (1992): The evaluation of algal growth potential and toxicity of water by miniaturized bioassay, in immunological plates. - *Water Research* 26:1409-1413.
- LUKAVSKÝ, J. (1984): Mikrometoda stanovení trofického potenciálu a toxicity vody řasovým testem. - *Vodní hospodářství B* 3:79-83.
- MARVAN, P. (1970): Toxicita vod – provádění a hodnocení testů toxicity. – Bulletin metodického střediska chemicko-technologických laboratoří 8: 105-126.
- MARŠÁLEK, B. & ROJÍČKOVÁ, R. (1995): Využití alternativních biotestů pro ekotoxikologický monitoring I. Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí. - Sborník konference, Milenovice, Aquachemie Ostrava, p. 12-15.
- ROTH, Z., JOSÍFKO, M., TRČKA, V. & MALÝ, V., (1962): Statistické metody v experimentální medicíně. - Státní zdravotnické nakladatelství, Praha, 325 p.