

Statistické vyhodnocování řasových biotestů

Statistical evaluation of algal toxicity bioassays

Vladimír K o č í, Martin M l e j n e k & Jiří B u r k h a r d

*Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT, Technická 5,
CZ-160 00 Praha 6.*

vladimir.koci@vscht.cz , <http://www.sweb.cz/ekotoxikologie/>

Abstract

The article deals with the problems of statistical presentation of algal toxicity tests. We performed 12 and 10 parallel cultivations of algal suspensions in standard condition for toxicity assays. We suggest that the deviation up to 15%, determined by Probit analysis is not fully adequate for determination of EC50 for algal bioassays. Log-Lin linear regression fits better for experimental data. Only concentrations with inhibition effects from 20% to approximately 80% are recommended for calculation. For NOEC we recommend to choose the highest tested concentration with inhibition effect under 20%. Consequently, the next higher concentration with inhibition effect $\geq 20\%$ is recommended for LOEC determination.

Úvod

V minulém čísle Czech Phycology (Kočí 2000) bylo položeno několik otázek, jež upozorňovaly na nedořešené problémy statistické interpretace řasových biotestů. V tomto stručném sdělení bude navržen způsob interpretace výsledků řasových testů toxicity.

Oblast nízkých efektů

Důležitou otázkou pro vyhodnocování řasových biotestů je variabilita v nárůstu kontrol. Jinak řečeno, jde o to, z kolika procent se mohou lišit hustoty buněk v kontrolních suspenzích. Optimální by bylo, aby se lišily minimálně (do 5%), jako je tomu u ostatních testů toxicity (perloočky, ryby atd.). Realita taková není. Tato problematika byla naposledy diskutována na konferenci Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí (Gottwaldová, Svobodová 2001). Pracoviště, jež se touto problematikou zabývají delší dobu mají zkušenost, že odchylka až do 30% inhibice nemusí znamenat toxické účinky látek přítomných v testovaném vzorku, ale může se pouze jednat o přirozenou variabilitu systému. Na našem pracovišti jsme provedli řadu paralelních pokusů, kdy bylo nasazeno 12 resp. 10 řasových suspenzí a za standardních podmínek používaných pro testy toxicity byl sledován jejich nárůst až do 96 hodinové expozice. Relativní odchylky koncentrací buněk, určených

pro větší přesnost stanovení mikroskopicky, jsou uvedeny v závislosti na době kultivace v tabulce č.1. Po prvním dni, kdy je relativní odchylka vzhledem ke krátké době expozice a stejné počáteční koncentraci řasové suspenze 10,4% dochází ve druhém dni k nárůstu odchylky na 12,9 a ve třetím dni k dosažení maximální odchylky 15,0%. V následujícím čtvrtém dni již dochází k poklesu relativních odchylek na 10,9%. Minimální doba expozice testu toxicity je dle normy (ISO 8692: 1989) určena na 72 hodin. Vhodnější však je použití doby expozice alespoň 96 hodin. Z naměřených dat vyplývá, že odchylka se pohybuje do 15% a od minimální normativní expozice (72 hodin) k době expozice 96 hodin se snižuje. Výše zmíněné doporučení o 30% odchylce od kontroly se potvrdilo. Dojde-li ke kladné 15%ní odchylce v kontrole a záporné 15%ní odchylce v testované koncentraci obdržíme bezpečnostní interval 30%. Experimentální určení koncentrací toxikantů s nízkými efekty na růst řas (do 20-30% inhibice) nelze v běžně realizovatelných podmínkách (počet replikací) provádět.

Jak vyplývá z výše uvedeného, lze jen komplikovaně určovat hodnoty efektivních koncentrací pro nízká procenta inhibice. Jinak řečeno, variabilita přírodních systémů způsobuje oscilaci nárůstu biomasy okolo nulové hodnoty inhibice odpovídající nárůstu v kontrole v rozmezí 15%. To znamená, že určovat inhibiční koncentrace menší než 15 (EC15 a méně) je velmi obtížné, ne-li nereálné.

Výpočet EC50

Hodnota EC50 (efektivní koncentrace, kdy je zaznamenána odpověď na přítomnost toxické látky u 50% testovacích organismů) je dosud nejlepší hodnotou pomocí níž lze srovnávat toxické účinky různých látek na řasy. Pro vhodnou interpretaci naměřených dat a pro aplikaci do ochrany životního prostředí, odhadu rizik apod. má EC50 několik nevýhod. Vhodnější parametr však zatím není k dispozici.

Pro biotesty na řasách je k dispozici ČSN norma. Je v ní předepsáno určovat efektivní koncentrace EC50 z „od oka proložené přímky“ (str.9) nebo „Alternativně se vypočítá hodnota EC₅₀ některou technikou regresní analýzy, např. probitovou analýzou.“ (str.10) (ČSN EN 28692). Podrobnější návod zde chybí. Lze očekávat, že pracovník zabývající se řasovými biotesty má povědomí o statistickém vyhodnocování. Situaci však komplikují odlišné přístupy k výpočtu EC50.

Je realitou, že různé PC programy probitové analýzy poskytují trochu odlišné výsledky a často velmi odlišné intervaly spolehlivosti. Nejlépe se zatím osvědčily jednoduché programy v MS DOSu. Nevýhodou je, že pro mnohá pracoviště jsou tyto programy těžko dostupné. Další komplikace nastává při použití nových PC, kdy jejich rychlost komplikuje používání starších MS-DOS programů a je nutno užít paradoxní zpomalovací programy. Diskutabilní

zůstává, zda probitová analýza (FINNEY 1952), jež slouží k popisu regresního modelu sigmoidální závislosti „dose-response“ křivky testů s binární odpovědí (ano-ne, žije-nežije) je vhodná pro hodnocení nárůstů řasové biomasy ve srovnání s kontrolní suspenzí. Podstata probitové analýzy totiž spočívá v zahrnutí i nelineární části sigmoidální křivky do regresní funkce. V případě nízkých efektů se jedná o oblast nižší než 20% (Litchfield, Wilcoxon 1949) a zahrnování této oblasti v řasových testech je z výše uvedeného těžko možné. Pro výpočet hodnoty EC50 doporučujeme použít pouze lineární část „dose-response“ křivky, přibližně v rozmezí efektu 20-80% a aplikovat lineární regresi na závislost efektu v % na logaritmu koncentrace.

Závěrečná doporučení

1. Provádět řasový test alespoň po dobu 96 hodin do doby, kdy jsou již relativní odchylky nižší a vyhnout se tak nepřesnostem způsobeným vyššími relativními odchylkami ve 2 a 3 dni. Nejlépe je však provádět experiment až do doby poklesu koncentrace buněk, tedy do doby, kdy jsou z kultivačního média vyčerpány živiny. Tímto způsobem lze zaznamenat i prodloužení lagové fáze nárůstu suspenze v případě takového působení toxickou látkou. V závislosti na uspořádání experimentu, na kultivačních podmínkách, bývá tato doba 8-14 dní, u řasového mikrobiotestu 16-21 dní.
2. Pro výpočet inhibice růstu pomocí růstových rychlostí μ použít pouze data, pro která platila během expozice exponenciální fáze růstu u všech testovaných koncentrací. Zabráni se tak zkreslení výsledku ve fázi poklesu nárůstu suspenze v důsledku vyčerpání živin.
3. Pro oblast nízkých efektů doporučujeme prezentovat hodnotu EC20. Za NOEC (No Observed Effect Concentration) doporučujeme používat nejvyšší testovanou koncentraci ve které byla zaznamenána inhibice menší než 20%. Za LOEC (Low Observed Effect Concentration) lze pak považovat bezprostředně vyšší testovanou koncentraci pro kterou zákonitě platí inhibiční efekt $\geq 20\%$.
4. Vypočítávat EC50 pomocí lineární regrese pro závislost inhibice v % na logaritmu koncentrace.

Literatura

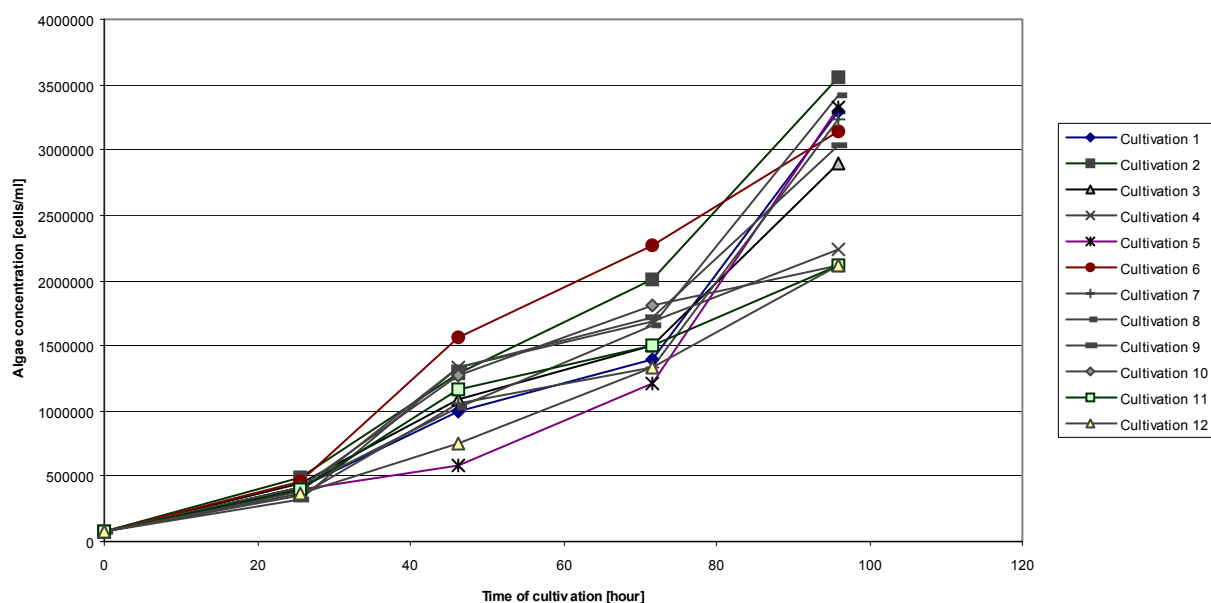
- ČSN EN 28692 757740. Jakost vod. Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692: 1989).
- FINNEY, D.J (1952). Probit Analysis: A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve (2nd edition). - Cambridge University Press, London.
- GOTTWALDOVÁ, V., SVOBODOVÁ, Z. (2001). Konferenci Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí. Ústní sdělení.
- KOČÍ, V.: Statistical questionmarks of the algal bioassays. - Czech Phycology, 1: 121-127, 2001.

KOČÍ, V.(2000) Prezentace výsledků ekotoxikologických dat. ERA 2000, 12.-15.3.2000. TOCOEN, RECETOX. Brno, str. 165-168.

LICHFIELD, J.T., WILCOXON, F.W. (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. - J. Pharm. Exp. Therap. 95, 99.

Graf 1. Růstové křivky 12ti paralelních kultivací.

Fig. 1. Growth curves of twelve parallel cultivations.



Tabulka č.1: Závislost relativní odchylky koncentrace buněk řasových suspenzí na době kultivace.

Table 1: Dependence of relative deviation of cell concentration on time of cultivation.

Doba kultivace, hod	24	48	72	96
Relativní odchylka, %	10,4	12,9	15,0	10,9