

Univerzita J. E. Purkyně, Ústí nad Labem
Fakulta životního prostředí

Empla AG s.r.o.



Vyhodnocování ekotoxikologických dat pomocí jednoparametrových sigmoidních křivek

Josef Trögl, Věra Pilařová, Kateřina
Benediktová



Výzkumné
centrum ARTEC

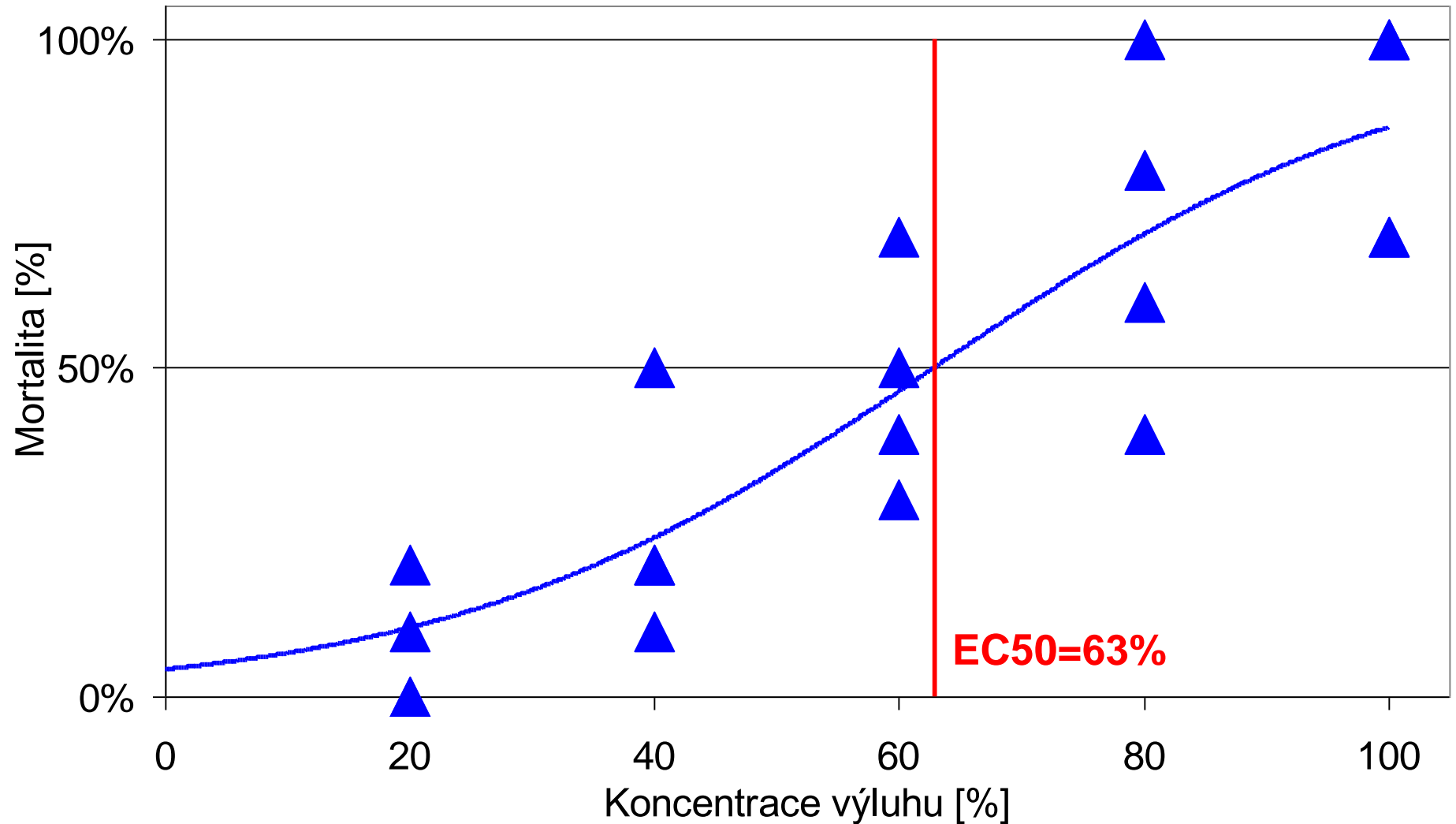
Úvod

- Zvyšující se legislativní požadavky na informace o nebezpečnosti látek včetně údajů o ekotoxicitě

X

- Snaha o eliminaci testů na organismech
→ plně nereálné → alespoň snížení
– **etický i ekonomický přínos**

Koncentračně-inhibiční závislost



- Nelineární regrese dvouparametrovou logistickou křivkou (Boltzmanova sigmoida):

$$I = \frac{1}{1 + e^{\frac{EC50 - c}{m}}}$$

- Iinhibice $\langle 0;1 \rangle$
- ckoncentrace
- $EC50$koncentrace způsobující $I=0,5$
- mkoeficient strmosti křivky

Experimentální část

- V laboratořích Empla AG s.r.o. a ekotoxikologické laboratoři VŠCHT Praha
- Testy s *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata*, *Desmodesmus subspicatus* a *Vibrio fischeri* dle příslušných norem
- Testy s *Artemia salina* v odstáté vodovodní vodě + NaCl (20 g/l) – 48 hodin expozice

Vzorky

- Převážně směsi – vzorky odpadů, výluhy z kalů, biodegradční produkty atd.
- Většina otestována více metodami
- Celkem 69 primárních koncentračně-inhibičních křivek

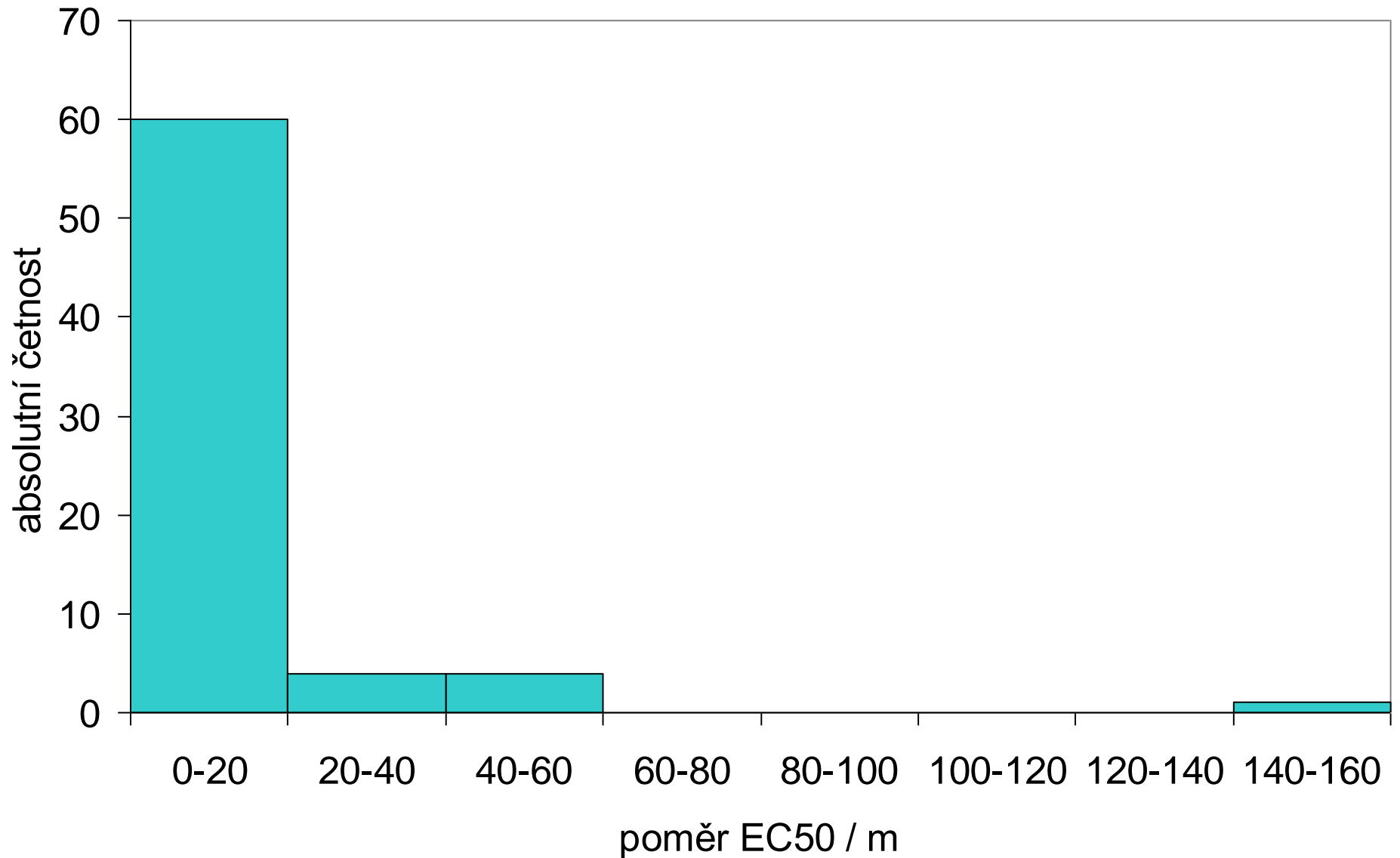
Odvození jednoparametrové logistické křivky

- Předběžná sada výsledků (9 vzorků, 4 organismy, celkem 32 křivek)
- **Vysoká korelace mezi EC50 a m ($r=0,90$)**
→ idea náhrady m za poměr **EC50/ k**
- S pevně daným k jednoparametrová křivka s fixovanou strmostí
- Potřeba určit nejpravděpodobnější k → rozšíření předběžné sady o nová data

Rozšířená sada dat – analýza poměrů EC50 / m

| Parametr | Hodnota |
|------------------------|----------------|
| Počet hodnot | 69 |
| Minimum | 0,89 |
| Maximum | 155,54 |
| Průměr | 11,24 |
| Medián | 4,23 |
| Horní vnitřní hradba | 18,44 |
| Počet odlehlých hodnot | 10 |

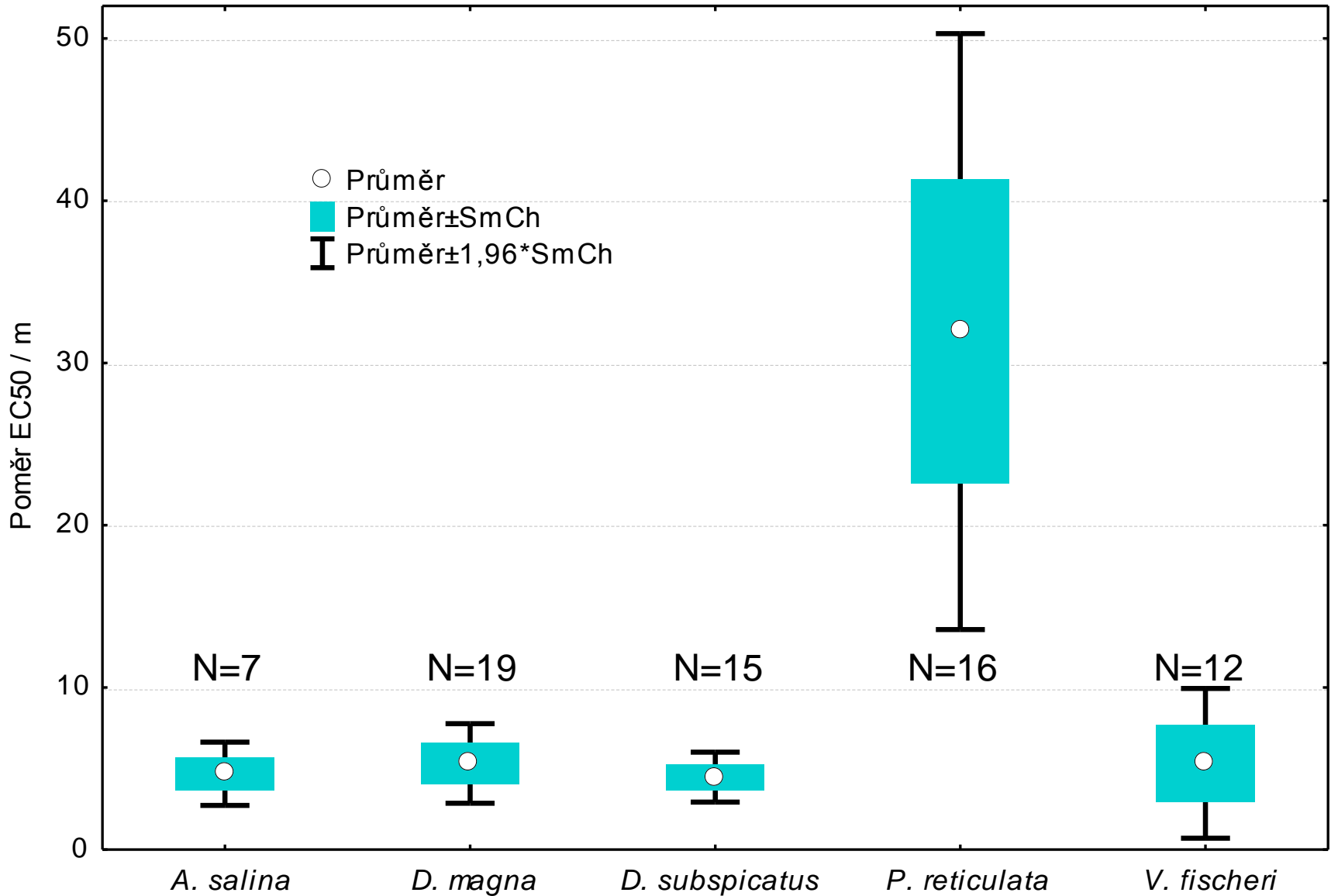
Histogram



Odlehle hodnoty

- 8 z 10 odlehlých hodnot je z testů na rybách
- možná závislost poměru EC50/m na organismu?
- Jednoparametrová ANOVA → c-I křivky z testů na rybách jsou významně strmější → vyřazení z další analýzy

ANOVA – vliv organismu

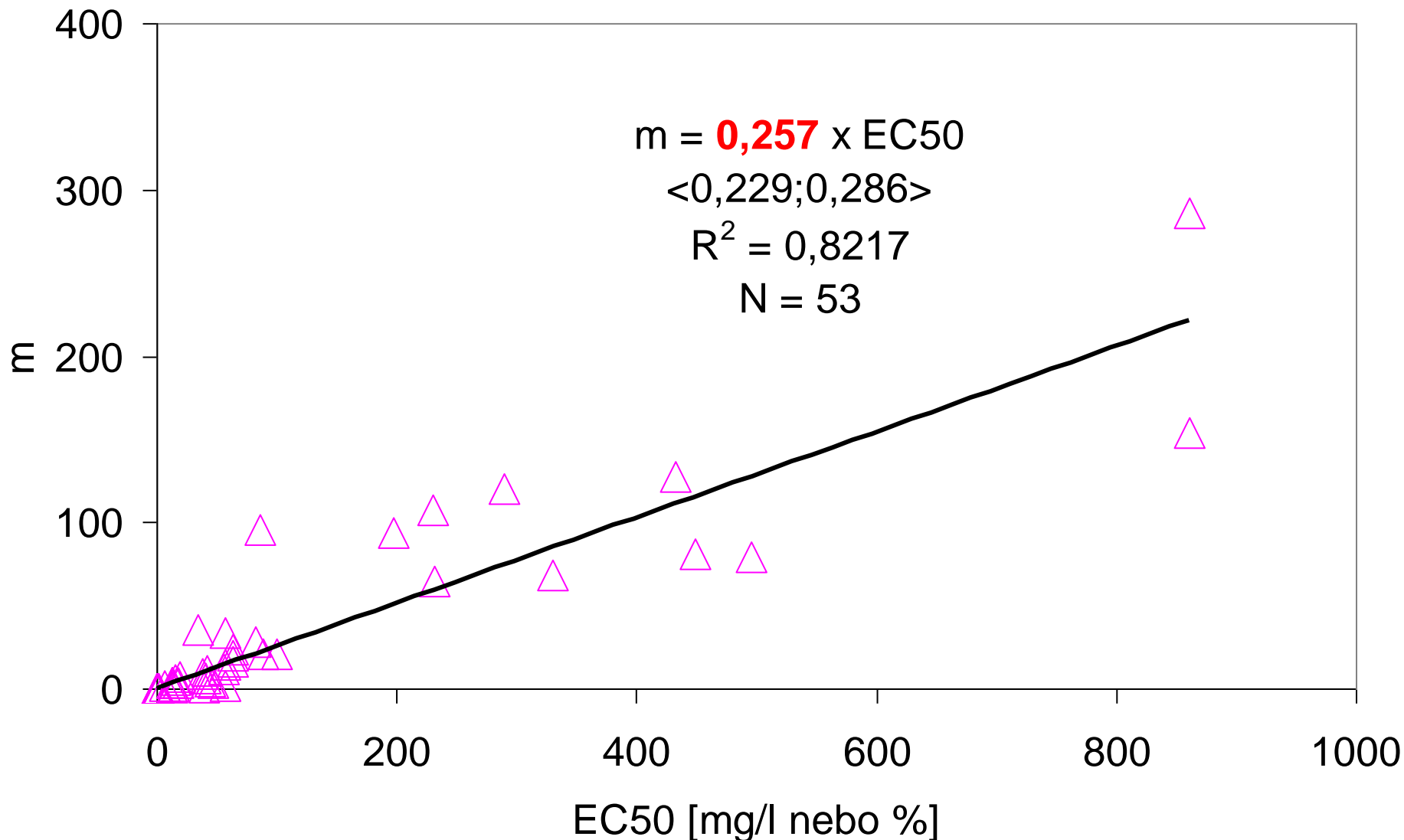


Odvození jednoparametrové logistické rovnice

- Lineární regrese závislosti EC50 na m
- $m = 0,257 \times EC50$

$$I = \frac{1}{1 + e^{\frac{EC50^{-c}}{EC50}}}$$

Odvození jednoparametrové logistické rovnice



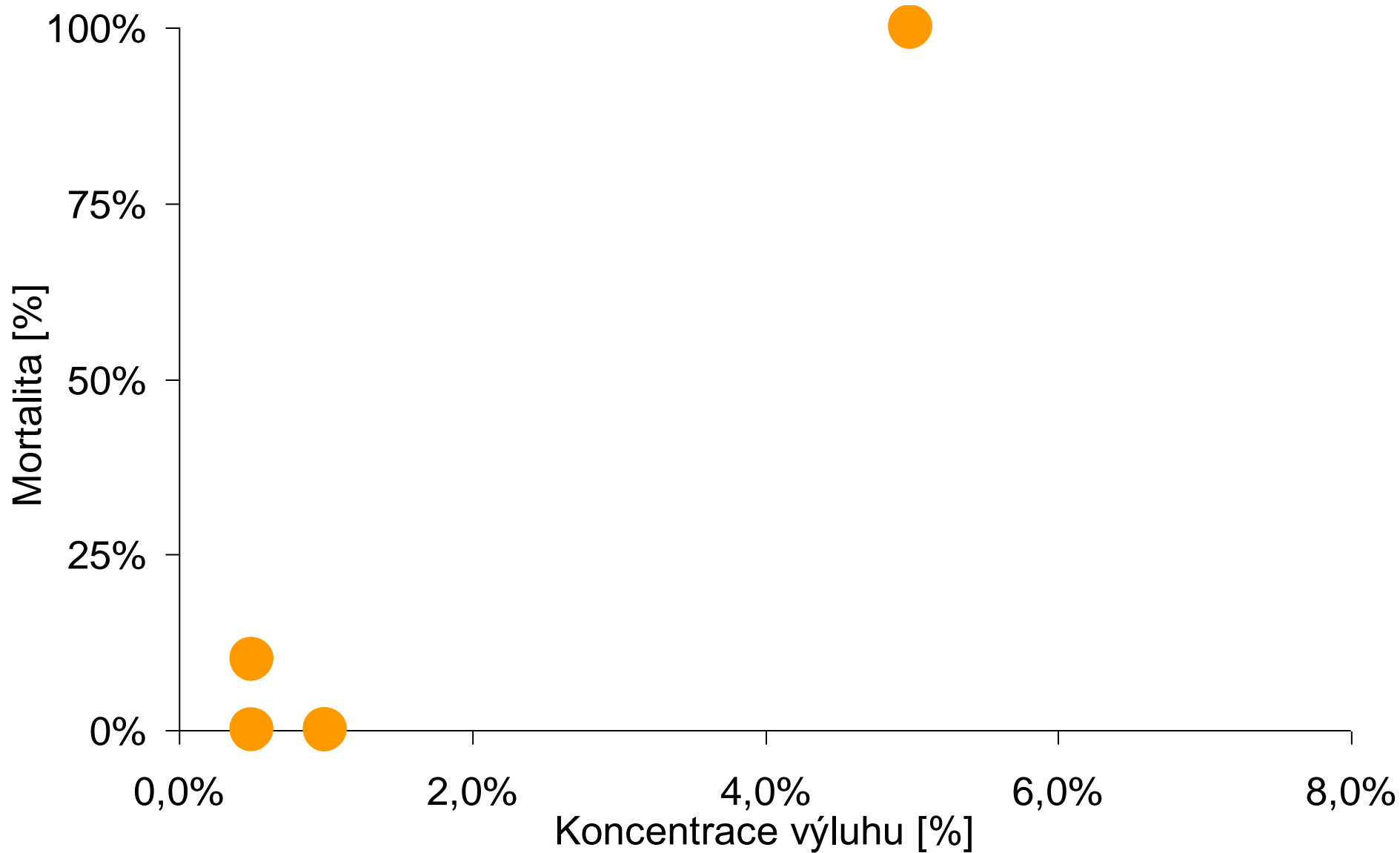
K čemu je to dobré?

- Odhad nižších ECXX pouze při znalosti EC50
- **Málo parametrů → potřeba méně experimentálních hodnot**
- Přesnější odhady EC50 z „horších“ a předběžných dat
 - úspora použitých organismů i nákladů na testy

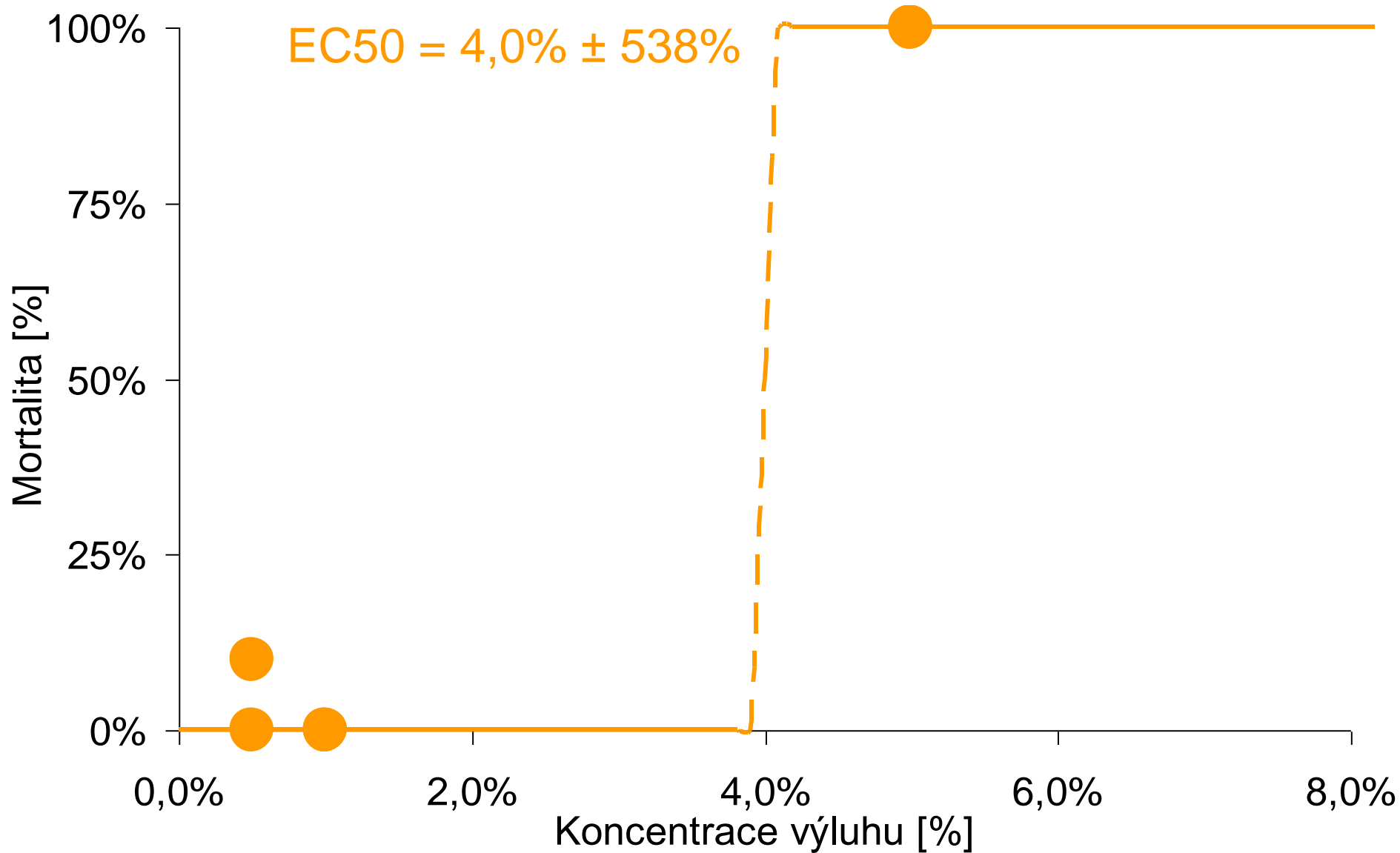
Typické pořadí testů

1. **Limitní test** – 3 opakování 100 mg/l (100%)
2. **Předběžný test** – určení koncentračního rozmezí EC50
3. **Základní test** – určení EC50

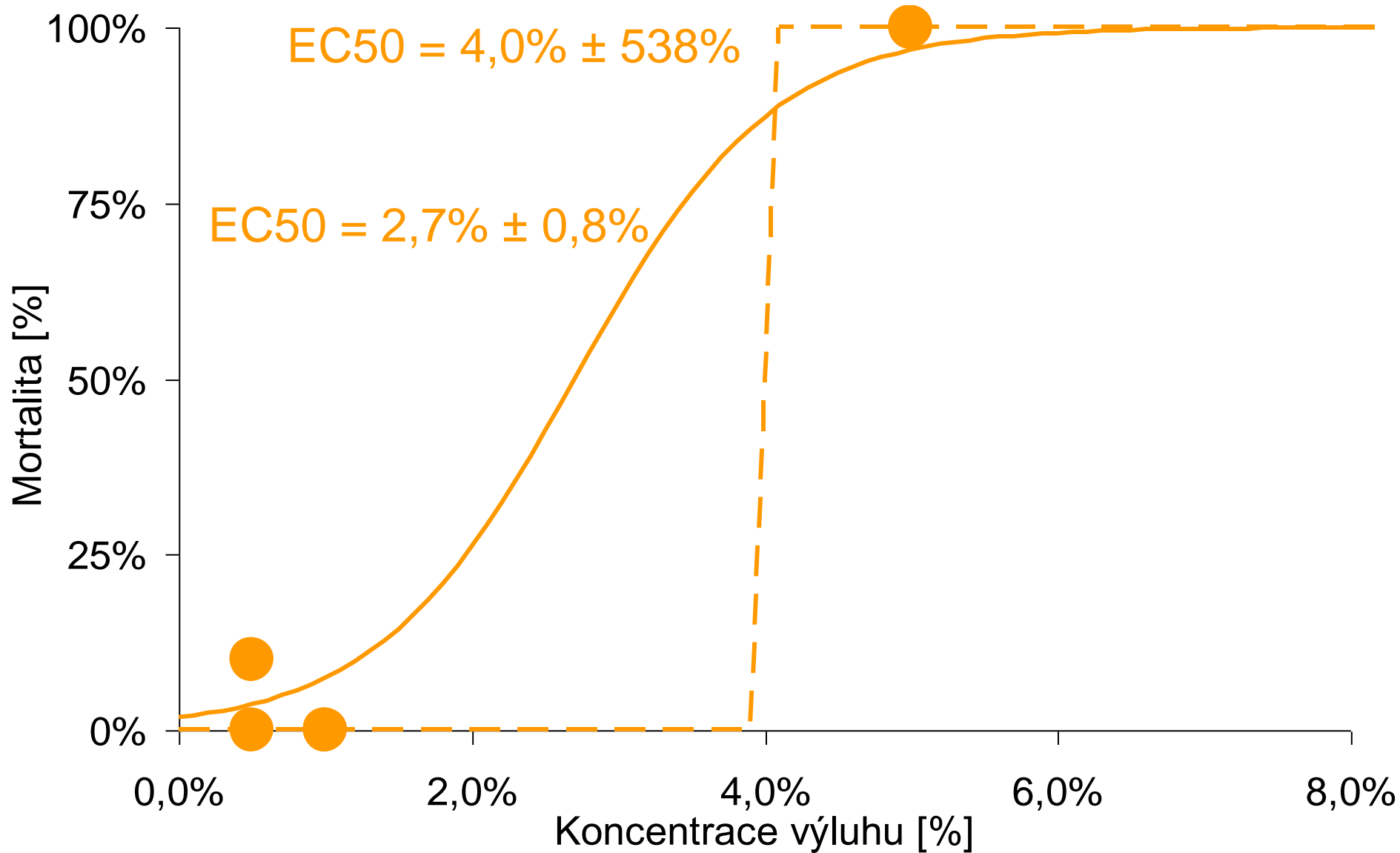
Př. 1: Nepřesný předběžný test



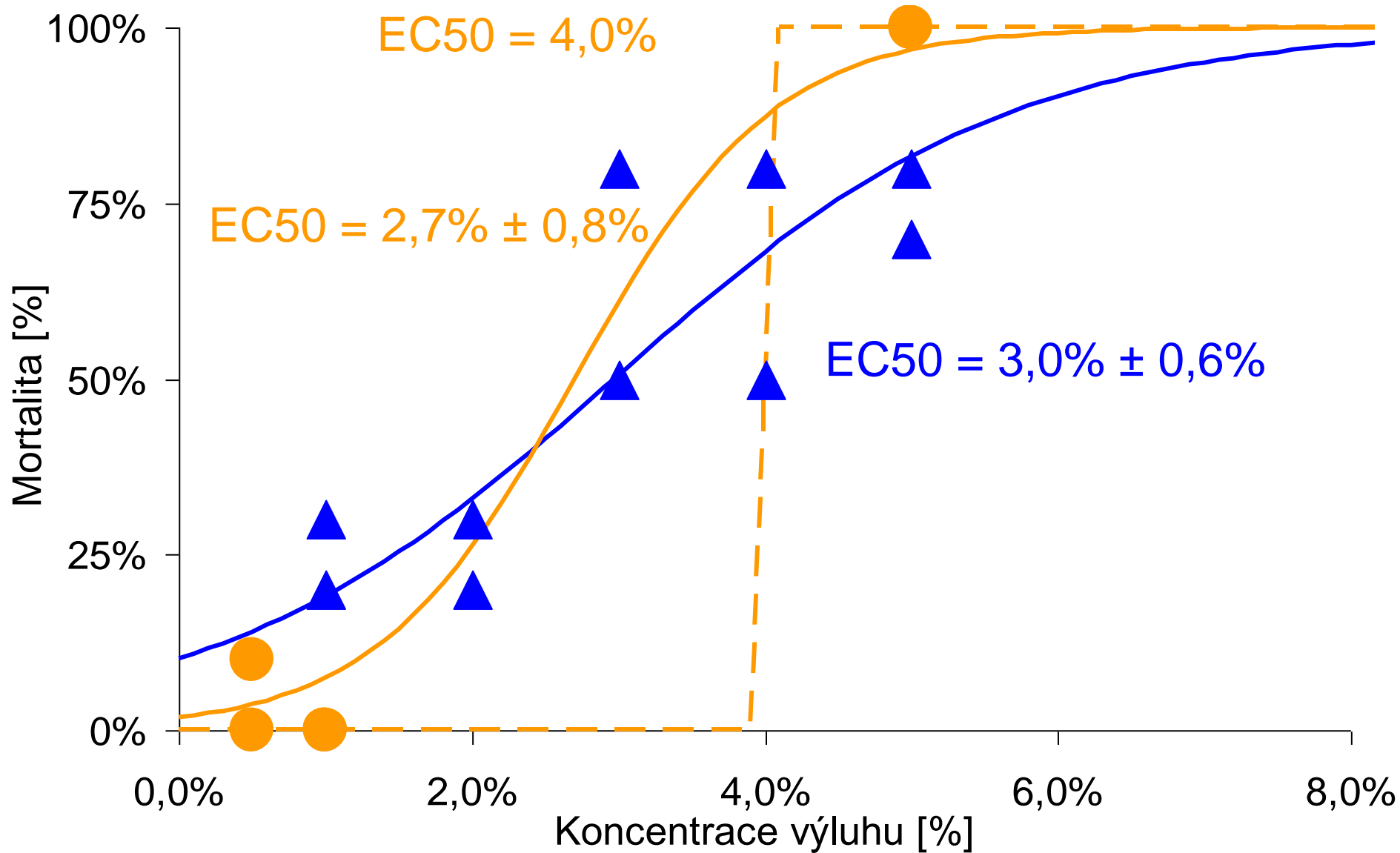
Př. 1: Nepřesný předběžný test



Př. 1: Nepřesný předběžný test



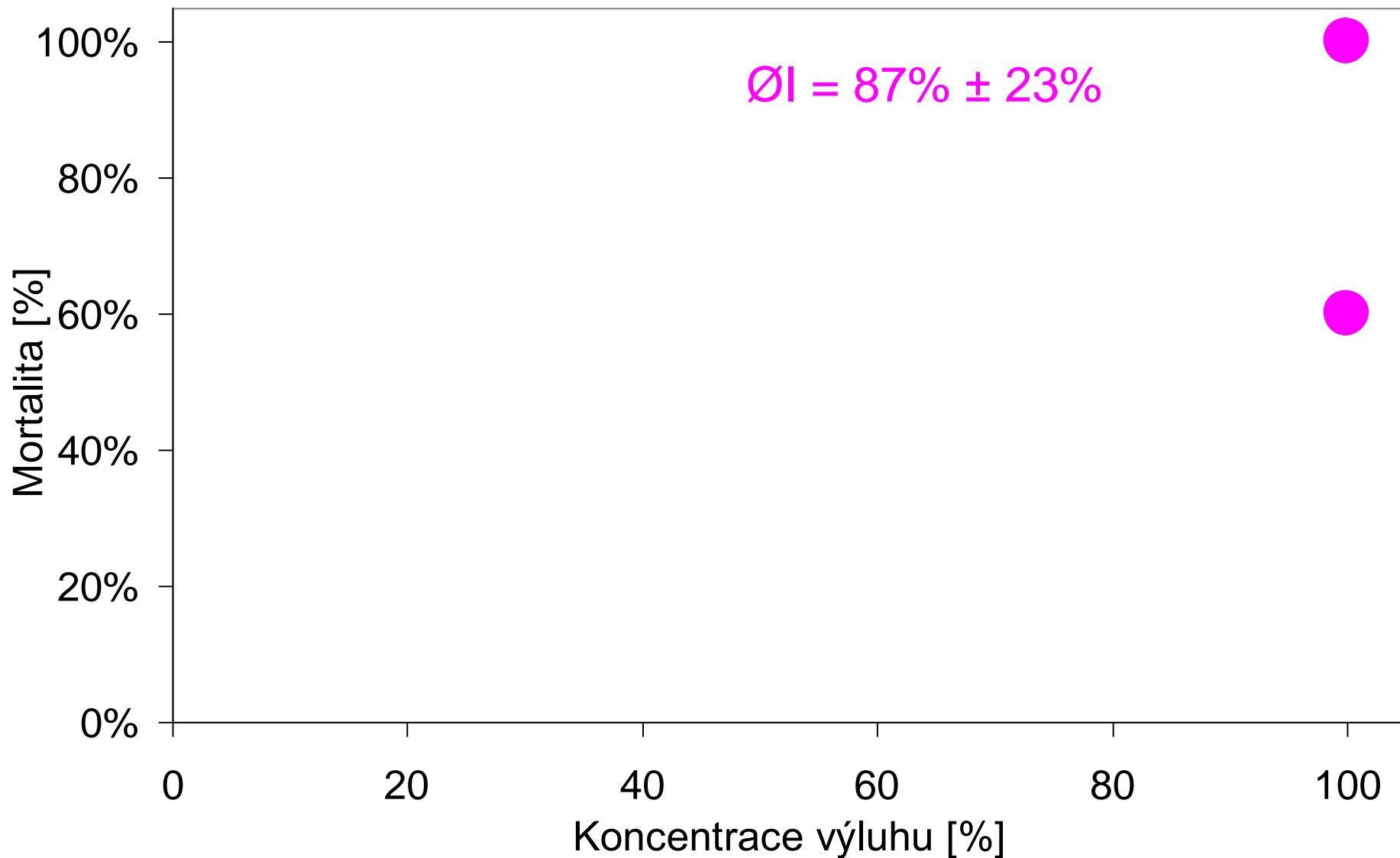
Př. 1: Nepřesný předběžný test



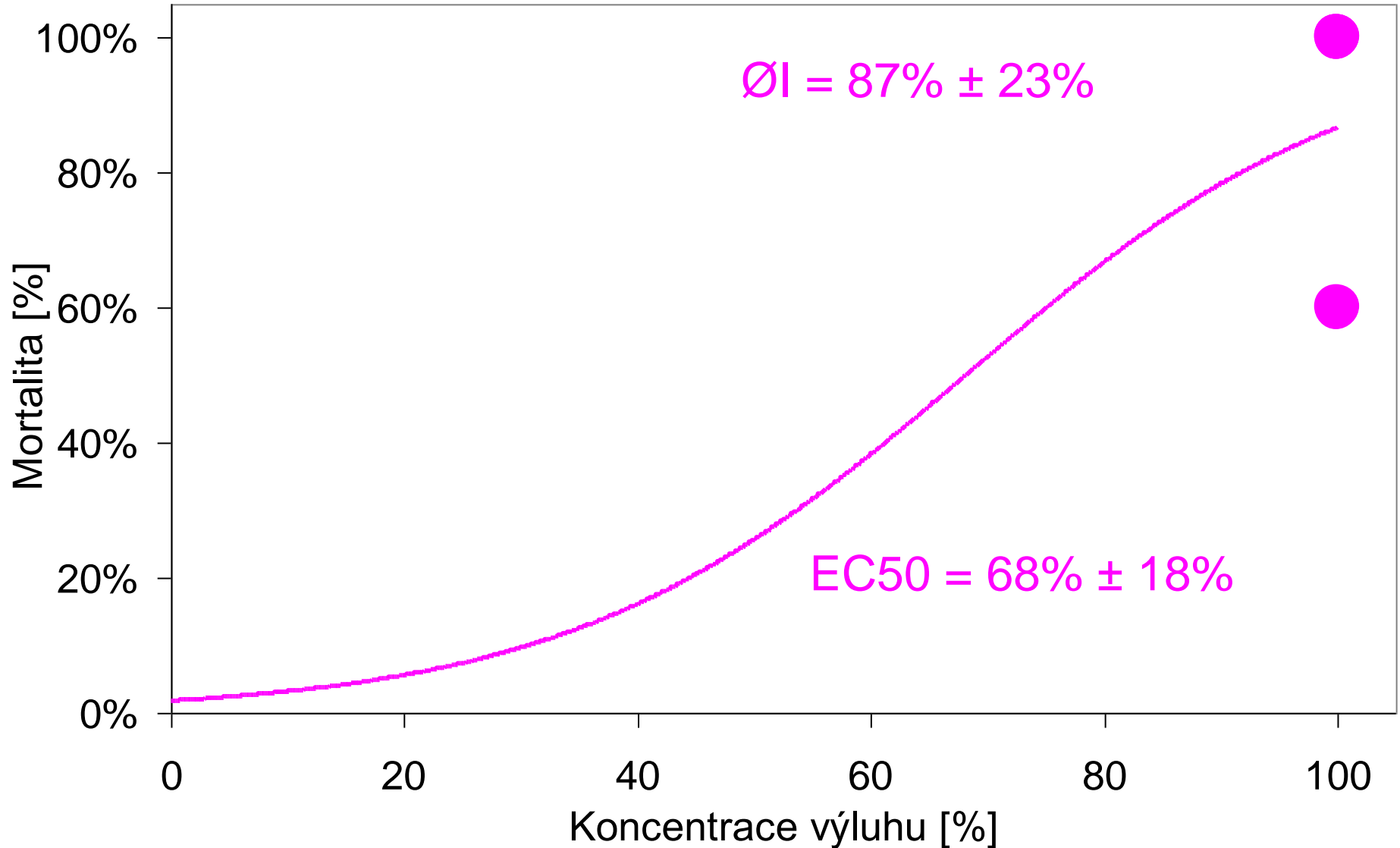
Př. 2: Odhad EC50 z limitního testu

- Je-li inhibice v limitním testu nižší než 100%, pak lze odhadnout EC50 dosazením do jednoparametrové sigmoidy

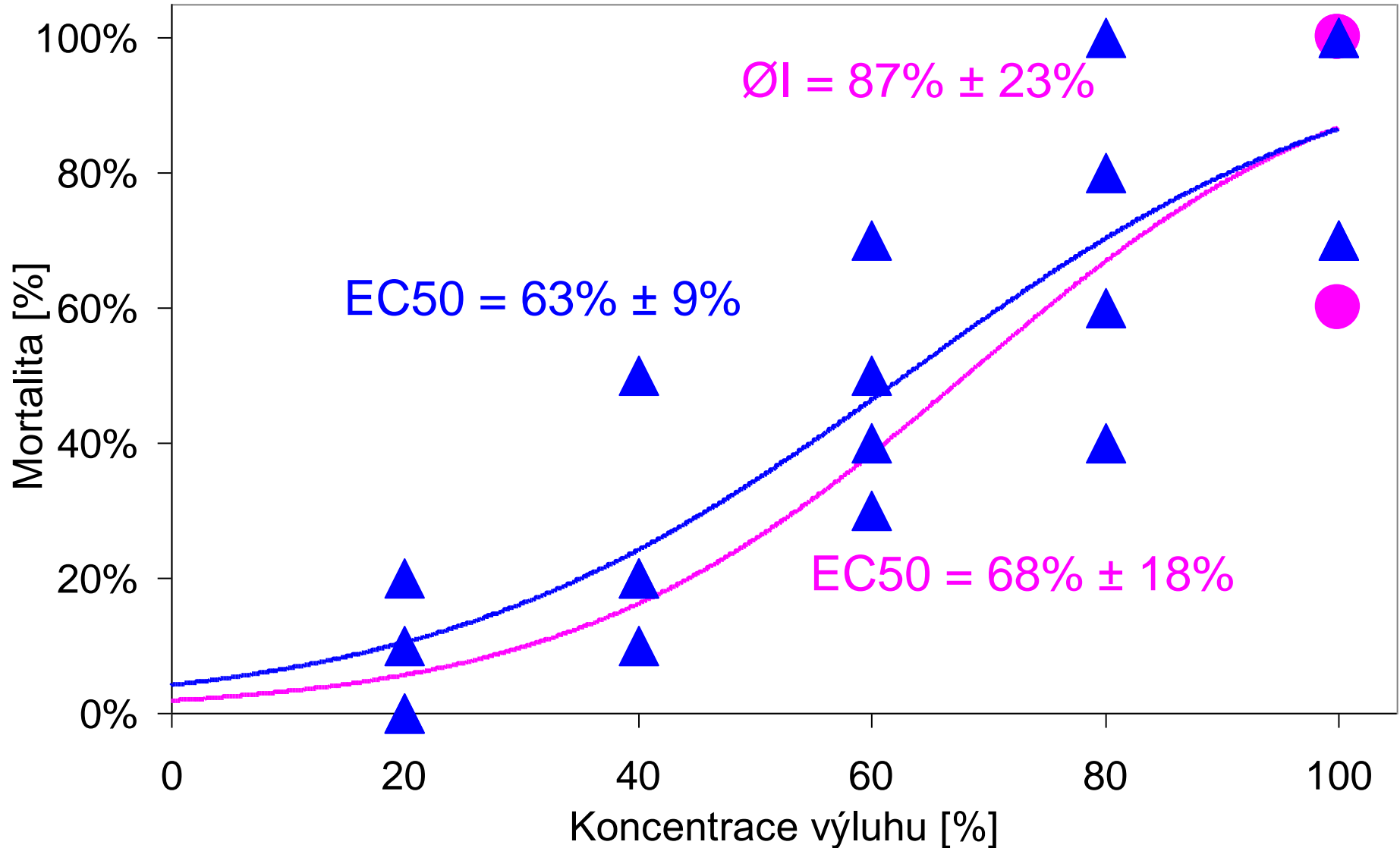
Př. 2: Odhad EC50 z limitního testu



Př. 2: Odhad EC50 z limitního testu



Př. 2: Odhad EC50 z limitního testu



Limitní testy

- U většiny limitních testů vychází $3 \times 100\%$ inhibice → z hlediska koncentračně-inhibiční závislosti nepoužitelné
- Vhodnější by bylo testovat 3 odlišné koncentrace
 - vyšší pravděpodobnost $0\% < I < 100\%$
 - např. 100 – 10 – 1 [mg/l resp. %]

Otázky k řešení

- Proč jsou křivky z rybích testů strmější?
 - Výrazně odlišný mechanismus účinku?
 - Obecně horší kvalita dat z rybích testů? – málo koncentrací s účinkem $0\% < I < 100\%$

Otázky k řešení

- Na čem závisí strmost logistické křivky?
 - Organismus?
 - Laboratoř?
 - Hodnota EC50?
 - Směs vers. čistá látka?
 - Mechanismus účinku?
 - Doba expozice?

Otázky k řešení

- Je třeba vyhodnotit **řádově vyšší** množství experimentálních dat s vyšší variabilitou
 - laboratoře
 - látky
 - organismy
- **Prosba o data**

Poděkování

- Emple AG s.r.o. za poskytnutí dat
- MŠMT za finanční podporu (projekt 1M0554)
- Ing. Václavu Synkovi za cenné statistické rady
- Vám za pozornost

