

JISTOTY V NEJISTOTÁCH ZKOUŠEK EKOTOXICITY

ABITEC

**SIMONA VOSÁHLOVÁ, ROBIN KYCLT, VÍT MATĚJŮ, SANDRA
PŠENIČKOVÁ**

ABITEC, S.R.O., INFO@ABITEC.CZ, LABORATOR@ABITEC.CZ

RADIOVÁ 7, 102 31 PRAHA 10

NEJISTOTA MĚŘENÍ

- nezáporný parametr charakterizující rozptýlení hodnot veličiny přiřazených k měřené veličině na základě použité informace.
- Popsána pro fyzikální a chemickou metrologii.
- v ISO/IEC Guide 98-3: 2008, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, označované jako GUM
- EURACHEM - překlad v edici KVALIMETRIE, svazek 13, 19.
- Obecně platí, že GUM se rovněž používá při zkoušení, i když existují významné rozdíly mezi procesy měření a zkoušení. Samotná povaha některých postupů pro zkoušení může mít za následek, že je obtížné aplikovat striktně zásady GUM.

NEJISTOTA MĚŘENÍ

- V **chemických analýzách** je nejistota analytického postupu a nejistota konečného výsledku dané metody obvykle stejná. Obvykle se zamítá možnost, že může být na nejistotě jednotlivé analýzy něco jedinečného.
- U **zkoušek biologických** (mikrobiologie, ekotoxicita) se musí určitá variabilita chování organismu předpokládat.
- Nejistoty mikrobiologických zkoušek - ČSN ISO 29201.
- Zdravotnické laboratoře - ISO TS 10914.
- Ekotoxicita - žádný dokument pro vyjadřování nejistot.

NEJISTOTA MĚŘENÍ X AKREDITACE PODLE ČSN EN ISO/IEC 17025

- kap. 7.6.3 laboratoř provádějící zkoušení **musí vyhodnocovat nejistoty** měření. Tam, kde zkušební metoda neumožňuje rigorózní vyhodnocení nejistoty měření, musí se provést odhad na základě pochopení teoretických principů metody nebo praktických zkušeností z provádění dané zkušební metody.
- kap. 7.8.3 Specifické požadavky na **protokoly** :
protokoly o zkouškách musí tam, kde je to nezbytné pro interpretaci výsledků zkoušek, obsahovat v příslušných případech nejistotu měření, když **nejistota měření ovlivňuje shodu s mezí specifikace.**

NEJISTOTA MĚŘENÍ X LABORATOŘ

Vyhodnocení nejistoty měření:

- může přispět k řízení rizik v laboratoři,
- k zavádění nápravných opatření,
- umožňuje optimalizovat metodu,
- zvyšuje důvěryhodnost výsledku,
- může i snížit náklady na zkoušku tím, že není nutné kalibrovat zařízení, které nepřispívá významně do celkové nejistoty měření.

NEJISTOTA MĚŘENÍ BIOLOGICKÝCH ZKOUŠEK

Faktory, které lze obtížně vyhodnocovat:

- proměnlivost mezi jednotlivými organismy díky genetickým rozdílům – řešení náhodným výběrem organismů;
- rozdíly v podmínkách prostředí, za kterých jsou organismy chovány před zkouškou, které mají za následek epigenetické změny – řešení aklimatizací organismů na podmínky zkoušky;
- heterogenita podmínek zkoušky pro jednotlivé organismy – řešení náhodným rozmístěním nádob v termostatu;

NEJISTOTA MĚŘENÍ BIOLOGICKÝCH ZKOUŠEK

Faktory, které lze obtížně vyhodnocovat:

- variabilita u jednoho organismu (změny v čase – např. produkce hormonů);
- chyby měření – řešením je provádění zkoušek pouze zkušenými laboranty;
- organismy se mohou svým chováním a odezvou z neznámých důvodů lišit v jednotlivých nádobách, mohou se navzájem ovlivňovat svými odezvami – řešení paralelními stanoveními.

Nejistotu zkoušek ekotoxicity vyjádřit lze, avšak žádná ze strategií nemůže poskytnout nezpochybnitelný odhad nejistoty. **Vždy se něco předpokládá bez možnosti kontroly platnosti v dané situaci.**

NEJISTOTA MĚŘENÍ BIOLOGICKÝCH ZKOUŠEK

Podmínky provedení a vyhodnocení zkoušek ekotoxicity a chemických zkoušek se významně liší.

Zkoušky ekotoxicity pracují se zkušebním organismem, jehož aktuální kondice se mění, proto jsou přizpůsobeny podmínky zkoušky:

- zkoušky ekotoxicity mají ve svých zdrojových dokumentech vždy vyjmenovánu řadu podmínek, za kterých je zkouška platná, což zajišťuje správné provedení zkoušky (např. chování organismů v kontrolním vzorku bez zkoušeného vzorku, výsledky se standardní látkou, variační koeficient paralelních stanovení atd.);

NEJISTOTA MĚŘENÍ BIOLOGICKÝCH ZKOUŠEK

- v kontrolním vzorku se vždy připouští mírná indispozice zkušebního organismu a v závislosti na zkoušce se připouští obvykle 5 % až 10 % inhibice sledovaného parametru;
- zkoušky se provádějí vždy v paralelních stanoveních (2 až 5);
- výsledky se vzorkem se vždy porovnávají s netoxickou kontrolou;
- výsledkem zkoušky je buď **inhibice** při jedné koncentraci vzorku, nebo se stanovuje hodnota **EC_x** – účinná koncentrace, při které dochází k inhibici sledovaného parametru x %, popř. **LC₅₀** - letální koncentrace, při které dochází k 50 %nímu úhynu zkoušeného organismu;

NEJISTOTA MĚŘENÍ BIOLOGICKÝCH ZKOUŠEK

- Při stanovení EC_x se zavádí předpoklad, že data mají monotónní vztah dávka-odezva. Mezi omezení při vyhodnocování patří odhad hodnot EC_x mimo měřené koncentrační rozmezí – přináší velkou nejistotu (extrapolace mimo rozsah měření). Mírné odchylky mohou vzniknout i při použití různé výpočtové metody EC_x (Probitová analýza, nelineární regrese) nebo použitím různého software (např. ToxRat - ToxRat Solutions, Německo, Prism - GraphPad, USA).
- Vyjádření nejistoty měření akvatických zkoušek ekotoxicity je jednodušší než u zkoušek terestrických a je zatíženo méně neznámými.

HODNOCENÍ EKOTOXICITY ODPADŮ

- Zkušební laboratoř - akreditována podle ČSN EN ISO/IEC 17025.
- ČIA vyžaduje pro interpretaci výsledků nebo pro vyjádření shody se specifikací zahrnout nejistotu měření pro všechny zkoušky, včetně zkoušek ekotoxicity, pokud není v legislativě uvedeno jinak.
- Podle sdělení odboru odpadů MŽP „Limitní hodnoty ukazatelů – interpretace výsledků zkoušek“ je uveden **požadavek na interpretaci pouze chemických látek**: Limit je pevně stanovená hodnota a výsledek zkoušky je interval, ve kterém se nacházejí výsledky s určitou pravděpodobností. Pro dosažení shody s limitem musí celý interval ležet pod limitem. Platí pro odpady, u kterých koncentrace sledovaných **chemických ukazatelů** jsou normálně rozdělené.

LEGISLATIVA ODPADŮ

Vyhláška č. 294/2005 Sb., Příloha č. 10		
Tabulka č.	Organismus	Limit
10.2 neřaděný výluh	Ryby	0 %
	Dafnie	30 %
	Řasy	± 30 %
	Hořčice	± 30 %
10.4 neřaděný výluh	Luminiscenční bakterie	± 20 %
	Dafnie	20 %
	Řasy	± 20 %
50 %hm.	Salát terestrický	± 30 %

Ekotoxicita podle Tabulky č. 10.2. - toxicita způsobená látkami ve vodě málo rozpustnými nebo nerozpustnými nebude prokázána.

LEGISLATIVA ODPADŮ

Vyhláška č. 94/2016 Sb., Příloha č. 10

Tabulka č.	Organismus	Limit
I.1	Ryby	LC50 ≤ 10 ml.l ⁻¹
	Dafnie	EC50 ≤ 10 ml.l ⁻¹
	Řasy	IC50 ≤ 10 ml.l ⁻¹
	Hořčice	IC50 ≤ 10 ml.l ⁻¹
I.2 Výluh 100 ml.l ⁻¹	Luminiscenční bakterie	20 %
	Dafnie	20 %
	Řasy	± 20 %
10 %hm.	Salát terestrický	± 30 %

Vlastník odpadu se může rozhodnout, kterou sadu zkoušek využije.

LIMITNÍ HODNOTY

- Podle **norem** – statistické porovnání vzorku s netoxickou kontrolou.
- Vypočtená inhibice menší než 10 %, pak obvykle není statisticky významný rozdíl mezi kontrolou a vzorkem.
- **Legislativa** – číselná hodnota pro inhibici nebo EC_{50} .
- Nejistota zkoušek ekotoxicity není legislativou řešena a při tvorbě limitních hodnot nebyla uvažována.

LIMITNÍ HODNOTY A NEJISTOTA MĚŘENÍ

- Tam, kde je limitní hodnota 0 % (např. zkouška s rybami), ztrácí uvedení nejistoty měření jakýkoli smysl.
- Při vyjádření výsledku hodnotou EC_{50} se vždy zároveň uvádí interval spolehlivosti výpočtu s 95 % pravděpodobností. Jakým způsobem by se postupovalo při současném zohlednění nejistoty měření? Jak by se vyjádřil interval spolehlivosti? Někdy laboratoře uvádějí jako výsledek hodnocení nebezpečnosti odpadů údaj $EC_{50} (LC_{50}) > 10$ ml/l. Nejedná se o žádný konkrétní výsledek, má zde pak smysl uvádění nejistoty měření?

Hlavní zdroje nejistot zkoušek ekotoxicity zahrnutých v legislativě odpadů a výsledky zkoušení způsobilosti

Zkušební organismus	Hlavní příspěvek nejistoty zkoušky v laboratoři ABITEC, s.r.o.	Standard		Odpad
		ABITEC EC ₅₀ CV [%]	ISO ^a EC ₅₀ CV _R [%]	CSlab ^b EC ₅₀ CV _R [%]
<i>Poecilia reticulata</i>	Zkouška se standardní látkou (K ₂ Cr ₂ O ₇)	20,3	-	33,0 12 lab
<i>Daphnia magna</i>	Zkouška se standardní látkou (K ₂ Cr ₂ O ₇)	26,2	50,0 34 lab	54,0 13 lab
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Osvětlení, reprodukovatelnost kontroly, zkouška se standardní látkou (K ₂ Cr ₂ O ₇)	14,3	14,0 16 lab	48,0 13 lab
<i>Sinapis alba</i>	Kvalita semen, měření kořenů, zkouška se standardní látkou (K ₂ Cr ₂ O ₇)	37,5	-	39,7 12 lab
<i>Vibrio fischeri</i> (<i>Aliivibrio fischeri</i>)	Kvalita bakterií podle certifikátu dodavatele, zkouška se standardní látkou (ZnSO ₄ ·7H ₂ O), 30 min expozice	7,7	23,2 2 lab	31,0 7 lab
<i>Lactuca sativa</i>	Měření kořenů, zkouška se standardní látkou (H ₃ BO ₃)	11,0	-	3,7 ^c 7 lab

CV – variační koeficient

lab – laboratoř

a – výsledky zkoušení způsobilosti uvedené v příslušných ISO normách

b – výsledky zkoušení způsobilosti organizované společností CSlab, s.r.o. – průměrné výsledky variačního koeficientu reprodukovatelnosti CV_R vypočteného z aritmetického průměru z let 2013, 2015, 2016 a 2017

c - zkouška jen při 1 koncentraci vzorku, pouze z let 2016 a 2017.

LIMITNÍ HODNOTY A NEJISTOTA MĚŘENÍ

- Nejistota měření zkoušek ekotoxicity bude vyšší než pro běžné chemické analýzy.
- Největší variabilita výsledku se standardní látkou v laboratoři ABITEC byla zjištěna v akvatické zkoušce s růstem kořene hořčice.
- Podle variačního koeficientu reprodukovatelnosti uvedeného v příslušných normách je nejvyšší variabilita ve zkoušce s dafniemi.
- Výsledky zkoušení způsobilosti se vzorkem odpadu organizovaného společností CSlab, s.r.o. potvrdily nejvyšší variabilitu zkoušky s dafniemi.
- Variační koeficient reprodukovatelnosti ze zkoušení způsobilosti lze využít pro odhad nejistoty měření zkoušky.

NEJISTOTA MĚŘENÍ ZKOUŠEK EKOTOXICITY

- Rozšířená nejistota je založena na standardní nejistotě násobené koeficientem rozšíření $k = 2$, což pro normální rozdělení poskytuje hladinu spolehlivosti přibližně 95 %.
- Statistické vyhodnocení zkoušek ekotoxicity se provádí při hladině spolehlivosti 95 %. Navíc podmínky zkoušek (počet paralelních stanovení + CV), jsou specifikovány tak, aby bylo dosaženo dostatečné síly testu (chyby II. druhu).
- Podmínky zkoušky jsou definovány tak, aby pravděpodobnost chybného přijetí výsledku byla nízká. **Je správné používat při vyjádření nejistoty měření ještě koeficient rozšíření 2? Domníváme se, že díky nastavení podmínek zkoušek ekotoxicity v normách je hladina spolehlivosti 95 % již zahrnuta.**

ZÁVĚR

- Vyjádření nejistoty měření je pro laboratoř vždy přínosem. Pro zkoušky ekotoxicity by se měla nejistota měření vyjádřit zvláště pro zkoušku s 1 koncentrací vzorku a pro zkoušku dávka-odezva (EC_{50} , LC_{50}).
- Z hlediska nejistoty měření jsou v legislativě vhodnější limity pouze pro 1 koncentraci vzorku.
- Výhodou stanovení hodnot EC_{50} (LC_{50}) je bližší informace o toxicitě vzorku, zejména strmost křivky závislosti dávka-odezva. Vlastníka odpadu však obvykle zajímá pouze možný způsob likvidace odpadu a není pro něj důležité toxické chování odpadu.
- Při uvádění výsledku $EC_{50} > 10$ ml/l se vypovídací hodnota zkoušky dávka-odezva ztrácí, ale pro informaci na likvidaci odpadu podle legislativy je tento výsledek postačující.
- ČIA postupuje podle požadavků normy ČSN EN ISO 17025 a vyžaduje vyjádření nejistoty měření pro interpretaci všech výsledků nebo pro vyjádření shody se specifikací, pokud legislativa neuvádí jinak.

DOPORUČENÍ

- Odbor odpadů **MŽP** by měl vydat **sdělení pro interpretaci výsledků zkoušek ekotoxicity**, ve kterém by byly zohledněny specifické podmínky provádění a vyhodnocování zkoušek ekotoxicity, popř. by měly být limitní hodnoty v legislativě odpadů upraveny s ohledem na nejistotu měření. Druhou variantou je, že by se nejistota měření při interpretaci výsledků zkoušek ekotoxicity nezohledňovala.
- Doporučujeme ve vyhlášce č. 94/2016 Sb., v Tabulce I.1 upravit limitní hodnoty tak, aby byla zkoušena jedna koncentrace vzorku nebo zachovat pouze Tabulku č. I.2.



DĚKUJI ZA POZORNOST

VÝZKUM BYL FINANCOVÁN MPO ČR V RÁMCI PROJEKTU TRIO FVI047I.



ABITEC

www.abitec.cz