



UFZ-Bericht

UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht

UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

Nr. 25/1998

Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen

Multiple Kombinationen
von unähnlich wirkenden Substanzen
in niedrigen Konzentrationen

**L. Horst Grimme¹, Rolf Altenburger²,
Thomas Backhaus¹, Wolfgang Bodeker¹,
Michael Faust¹, Martin Scholze¹**

¹Institut für Zellbiologie, Biochemie und Biotechnologie
Universität Bremen

²UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Sektion Chemische Ökotoxikologie

ISSN 0948-9452

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ)



00408028

Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen

Multiple Kombinationen von unähnlich wirkenden Substanzen in niedrigen Konzentrationen

L. Horst Grimme¹, Rolf Altenburger², Thomas Backhaus¹, Wolfgang Bödeker¹,
Michael Faust¹, Martin Scholze¹



Gewässerforschung Magdeburg

¹Institut für Zellbiologie, Biochemie und Biotechnologie
Universität Bremen

²UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Sektion Chemische Ökotoxikologie

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 07OTX16 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Vorwort

Unter dem gemeinsamen Obertitel *Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen* wurden in den Jahren 1996 und 1997 mit finanzieller Unterstützung durch das Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie zwei kooperierende Forschungsvorhaben durchgeführt. Das erste dieser Vorhaben hat sich mit *multiplen Kombinationen von unähnlich wirkenden Substanzen in niedrigen Konzentrationen* befaßt (Förderkennzeichen 07 OTX 16). Es wurde in Zusammenarbeit der Universität Bremen mit dem Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle durchgeführt. Die Ergebnisse werden in diesem Bericht vorgestellt. Gegenstand des zweiten Vorhabens waren *binäre Kombinationen von unähnlich wirkenden Substanzen unter Bedingungen akuter und chronischer Exposition* (Förderkennzeichen 07 OTX 06). Es wurde am Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen bearbeitet. Die Ergebnisse dieses Kooperationsvorhabens werden in den Diskussionsteilen dieses Berichtes vergleichend berücksichtigt und sind in die Schlußfolgerungen mit eingeflossen. Unseren Kooperationspartnerinnen, Frau Dr. Brigitte von Danwitz und Frau Friederike Strüder sei an dieser Stelle für die gute Zusammenarbeit herzlich gedankt.

Zur erfolgreichen Durchführung dieses Projektes haben wissenschaftliche und technische Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen sowie Studenten und Studentinnen ganz wesentlich beigetragen. Namentlich besonders gedankt sei an dieser Stelle Kerstin Froehner, Veronica Hamer, Rico Hampel, Uta Kayser, Friedemann Kleint, Carsten Krumbholz, Erika Lorenz, Christian Schäfer, Maiko Schäfer, Katrin Wagenitz und Sascha Wolf.

Das in diesem Bericht dokumentierte Vorhaben hat die aquatische Toxizität multipler Gemische in experimentellen Untersuchungen an Monospezies-Tests analysiert. Damit konnten für die prospektive Risikobewertung von Chemikalien wichtige Fragen geklärt und gleichzeitig Voraussetzungen für weiterführende Arbeiten auf anderen Ebenen geschaffen werden. Dies sind einerseits Untersuchungen in freilandnahen Multi-Spezies-Tests und andererseits die Weiterentwicklung von Modellen der theoretischen Chemie (QSAR) zur Anwendung auf Fragen der Kombinations-Wirkungsanalyse. Diese Arbeiten werden in einem Anschlußvorhaben im Rahmen eines Europäischen Forschungsverbundes zwischen den Universitäten Bremen, Mailand und Göteborg sowie dem Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle mit finanzieller Unterstützung durch die Kommission der Europäischen Gemeinschaften vorangebracht. Die Ergebnisse werden zu Beginn des neuen Jahrtausends vorliegen.

Inhalt

1	Zusammenfassung	1.
2	Problemstellung	3.
3	Grundlagen und Ausgangspunkt	5.
	3.1 Anspruch.....	5.
	3.2 Vorhersage-Konzepte.....	7.
	3.3 NOEC's.....	12
	3.4 Wirkungs-Ähnlichkeit.....	17
	3.5 Erkenntnisstand.....	21
4	Arbeitsziele	29
5	Konzeption der Kombinations-Wirkungsanalyse	31
	5.1 Biotests.....	32
	5.2 Testgemische.....	36
	5.3 Mischungskomponenten.....	38
	5.4 Experimentelle Konzentrations-Wirkungsanalyse.....	39
	5.5 Biometrische Konzentrations-Wirkungsanalyse.....	40
	5.6 Operationalisierung der NOEC.....	41
	5.7 Vergleich mit Vorhersagen.....	41
6	Verfahren und Methoden	43
	6.1 Auswahl von Mischungskomponenten.....	43
	6.1.1 Ähnlich wirkende Mischungskomponenten.....	44
	6.1.2 Unähnlich wirkende Mischungskomponenten.....	46
	6.2 Experimentelle Methoden.....	49
	6.2.1 Algentest.....	51
	6.2.2 Leuchtbakterientest.....	53
	6.3 Biometrische Verfahren.....	55
	6.3.1 Konzentrations-Wirkungsanalyse.....	57
	6.3.2 Kombinations-Wirkungsanalyse.....	65
7	Mischungstoxizität ähnlich wirkender Stoffe (Referenzgemische)	73
	7.1 Ähnliche Wirkung im Algentest.....	73
	7.2 Ähnliche Wirkung im Leuchtbakterientest.....	84

8	Mischungstoxizität unähnlich wirkender Stoffe	99
8.1	Zusammensetzung der Testgemische	99
8.2	Toxizität der Einzelstoffe.....	102
8.3	Mischungstoxizität und Vorhersagbarkeit.....	110
8.4	Beitrag niedriger Effekt-Konzentrationen	118
9	Fazit	123
10	Diskussion	125
10.1	Eindeutigkeit und Modellabhängigkeit.....	126
10.2	Spezialfall oder Regelfall?	130
10.2.1	Binäre Gemische strikt unähnlicher Wirkung im Algentest.....	133
10.2.2	Akute und chronische Toxizität von Gemischen unähnlicher Wirkung im Daphnientest.....	136
10.3	Vorhersagewert der Konzepte für Gemische aus Stoffen unähnlicher Wirkung	138
10.4	Ähnlichkeitskriterien und der Umgang mit Nicht-Wissen.....	139
10.5	Kombinationseffekte durch Einzelstoff-Konzentrationen unterhalb der NOEC	141
10.6	Grenzen der Vorhersagbarkeit	144
10.7	Offene Fragen und Forschungsbedarf	145
11	Schlußfolgerungen und Konsequenzen	149
12	Literatur	151
	Anhang	161
	<i>Anhangsverzeichnis</i>	162
A	Stofflisten.....	165
B	Experimentelle Methoden.....	205
C	Biometrische Verfahren.....	215
D	Konzentrations-Wirkungsdaten.....	235
E	Vorhergesagte und beobachtete Effekt-Konzentrationen multipler Gemische.....	311

1 Zusammenfassung

Aufgabe des Projektes war es, mit Hilfe experimenteller Untersuchungen und biome-trischer Datenanalysen die folgenden Fragen zu beantworten:

1. Ist die aquatische Toxizität multipler Gemische unähnlich wirkender Stoffe vorher-sagbar?
2. Tragen niedrige, allein nicht signifikant wirksame Konzentrationen von Einzelstoffen zur Gesamtoxizität multipler Gemische bei?

Für die Vorhersage der Toxizität von Gemischen stehen zwei Konzepte zur Verfügung: KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG. Vorhersagen werden dabei aus Toxizitätsdaten von Einzelstoffen kalkuliert. Der Prognosewert dieser Konzepte wur-de vergleichend geprüft.

Exemplarische Untersuchungen wurden in einem Algentest mit *Scenedesmus vacuolatus* und einem Bakterientest mit *Vibrio fischeri* durchgeführt. Als Toxizitätsparameter dienen die Inhibierung der Reproduktion der Algen sowie die Biolumineszenzhemmung der Bakterien. In jedem der beiden Biotests wurde je ein Referenzgemisch *ähnlich* wirkender Stoffe und ein Gemisch *unähnlich* wirkender Stoffe untersucht. Zur Analyse der Mi-schungstoxizität *ähnlich* wirkender Stoffe wurde im Algentest ein Gemisch aus 18 s-Triazinen verwendet, welche spezifisch die Photosynthese inhibieren. Im Leuchtbak-terientest diente zu diesem Zweck ein Gemisch aus 16 substituierten Phenolen, welche als protonophore Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung wirken. Die Gemische *unähnlich* wirkender Stoffe setzten sich aus 16 bzw. 14 unterschiedlichen Herbiziden, Fungiziden und Antibiotika zusammen.

Konzentrations-Wirkungsanalysen wurden für sämtliche Einzelstoffe sowie für multiple Gemische durchgeführt. Die Experimente waren so konzipiert, daß eine statistisch valide Modellierung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von Einzelsubstanzen im Bereich von 1 % bis mindestens 80 % Effekt möglich war. Diese erfolgte durch die fallweise Aus-wahl eines "best fit" Modells aus einem Pool von 10 nichtlinearen sigmoiden Regres-sionsfunktionen. Die Gemische enthielten die Komponenten in zwei unterschiedlichen, jeweils konstanten Mischungsverhältnissen (Verhältnis der EC_{50} bzw. der EC_{01} der Einzel-substanzen). Experimentell bestimmte Mischungstoxizitätswerte wurden mit Vorhersagen verglichen. Zur Quantifizierung der Vorhersagegenauigkeit wurde der *Index on Prediction Quality* (IPQ) verwendet.

Unter Bezug auf die oben aufgeworfenen Fragen lassen sich die Ergebnisse wie folgt zusammenfassen:

1. Die Toxizität multipler Gemische *strikt unähnlich* wirkender Stoffe läßt sich unter Anwendung des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG exzellent vorhersagen, wäh-rend KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT die Toxizität überschätzt. Für multiple Gemische *strikt ähnlich* wirkender Stoffe liefert hingegen KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT sehr prä-zise Vorhersagen, während UNABHÄNGIGE WIRKUNG zur einer Unterschätzung der

Toxizität führt. Diese Aussagen gelten unabhängig vom Mischungsverhältnis, vom Effektniveau und vom verwendeten Biotest.

2. Geringe, allein nicht signifikant wirksame Konzentrationen von Einzelstoffen ($< \text{NOEC}^1$) führen in den untersuchten Gemischen insgesamt zu einer deutlichen Mischungstoxizität. Dies gilt sowohl für Gemische *ähnlich* wirkender Komponenten, als auch für Gemische aus *unähnlich* wirkenden Stoffen. Experimentell wurde dieser Sachverhalt für Situationen demonstriert, in denen sämtliche Mischungskomponenten in Konzentrationen vorlagen, die nach statistischer Schätzung alleine jeweils nur einen nicht signifikanten Effekt von 1 % auslösen würden. Daraus resultierten jedoch deutliche Gesamteffekte der Testgemische zwischen 15 und 95 %.

¹ NOEC - No Observed Effect Concentration

2 Problemstellung

Toxizität multipler Gemische

Abschätzungen des gewässertoxikologischen Gefährdungspotentials von Chemikalien gründen sich auf Labordaten, die in standardisierten Testverfahren an Bakterien, Algen, Wasserflöhen, Fischen und anderen Organismen gewonnen werden. Sie richten sich auf die Bewertung von Einzelstoffen. Die Lebensgemeinschaften der Gewässer sind jedoch meist einer Vielzahl von Umweltchemikalien ausgesetzt, die sich in ihrer Toxizität wechselseitig beeinflussen. Für die Gefahrstoffregulierung stellt sich damit die Frage, ob diesem Kombinationswirkungspotential in besonderer Weise Rechnung getragen werden muß, und wie dies angemessen geschehen kann. Die experimentelle Prüfung aller potentiellen oder auch nur der faktisch nachgewiesenen Mischungen von Substanzen kann allerdings von vornherein als praktisch unmöglich ausgeschlossen werden. Ein Ausweg muß daher in theoretischen Abschätzungen des Zusammenwirkens von Stoffen auf Basis vorhandenen Datenmaterials gesucht werden. Die Problemstellung kann somit auf folgende Frage zugespitzt werden: Erlaubt die Kenntnis der Toxizität von Einzelstoffen eine begründete Vorhersage für die Toxizität multipler Stoffgemische?

Vorhersage-Konzepte

Für die Vorhersage und Beurteilung von Kombinationswirkungen stehen zwei konkurrierende Konzepte zur Verfügung. Meist werden sie mit den Begriffen KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG bezeichnet. Beide Konzepte gestatten es, aus Toxizitätsdaten von Einzelstoffen Erwartungswerte für die Toxizität von Gemischen zu kalkulieren. Sie liefern damit sowohl Grundlagen für die *Vorhersage* von Kombinationseffekten als auch Maßstäbe für deren *Beurteilung*. Vergleichende Untersuchungen zum Vorhersagewert dieser Konzepte in der aquatischen Toxikologie haben sich bisher auf Kombinationen aus zwei Stoffen konzentriert (Grimme et al. 1996a). Inwieweit die Ergebnisse auf multiple Gemische übertragbar sind, ist unklar.

Unähnliche Wirkung

Nach Stand des Wissens ist die Vorhersagbarkeit der Toxizität von Stoffgemischen an die Frage geknüpft, ob die Komponenten eines Gemisches in dem betroffenen Organismus *ähnlich* oder *unähnlich* wirken. Konsens besteht darüber, daß im Falle eines identischen Wirkungsmechanismus und einer ähnlichen Wirkungsweise das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT eine begründete Annahme für das Zusammenwirken von Stoffen darstellt (Calamari und Vighi 1992). Strittig ist jedoch, wie eng oder weit der Begriff der *Wirkungs-Ähnlichkeit* gefaßt werden darf. Strittig ist auch, von welcher Hypothese im Falle *unähnlich* wirkender Mischungskomponenten auszugehen ist. Stellt KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT sozusagen die "general solution" dar (Berenbaum 1985) oder ist in dieser Situation von UNABHÄNGIGER WIRKUNG auszugehen (Pösch 1993)? Die reale Belastungssituation von Gewässern ist gerade durch eine Vielfalt von Substanzen unterschiedlichster Strukturen und Wirkeigenschaften gekennzeichnet. Die Frage nach der Vorher-

sagbarkeit der Toxizität multipler Gemische muß deshalb auf den Fall *unähnlich* wirkender Stoffe fokussiert werden.

Niedrige Konzentrationen

Typischerweise liegen die in Gewässern beobachteten Konzentrationen von Umweltchemikalien in Bereichen, die in Standardtestverfahren nur geringe oder gar keine statistisch signifikanten Effekte hervorrufen, sog. *No Observed Effect Concentrations (NOEC's)*. Unter diesen Bedingungen können die beiden Vorhersage-Konzepte zu dramatisch unterschiedlichen Abschätzungen der Mischungstoxizität führen. Ob solche niedrigen Konzentrationen überhaupt zur Toxizität eines Gemisches beitragen und ob sich in der Summe vieler, einzeln nicht signifikant wirksamer Mischungskomponenten dennoch insgesamt ein deutlicher unerwünschter Kombinationseffekt ergeben kann, ist ebenfalls strittig.

Fragen

In Zusammenfassung dieses Problemstandes war es die Aufgabe des Projektes folgende Fragen zu prüfen:

1. Ist die aquatische Toxizität multipler Gemische unähnlich wirkender Stoffe vorhersagbar?
2. Tragen niedrige, allein nicht signifikant wirksame Konzentrationen von Einzelstoffen zur Gesamtoxizität multipler Gemische bei?

Dazu wurden exemplarische Untersuchungen an ausgewählten Stoffgemischen und Bio-test-Systemen durchgeführt. Die Resultate ermöglichen eine rationale Einschätzung der Frage, ob bei umweltpolitischen Regelungsvorhaben grundsätzlich eine Berücksichtigung von Kombinationstoxizitäten erfolgen sollte.

3 Grundlagen und Ausgangspunkt

Die Umsetzung der Problemstellung in realisierbare Arbeitsziele erfordert eine Abgrenzung des *Anspruchs* (3.1). Sie basiert auf den bereits genannten theoretischen und konzeptionellen Grundlagen, nämlich den *Vorhersage-Konzepten* (3.2), dem Stellenwert von NOEC's in diesen Konzepten (3.3) und dem mit den Konzepten verknüpften Begriff der *Wirkungs-Ähnlichkeit* (3.4). Ausgangspunkt der Arbeiten war der *Erkenntnisstand* zur Vorhersagbarkeit von Mischungstoxizitäten in der aquatischen Toxikologie (3.5), wie er sich aus vorliegenden experimentellen Arbeiten ergab. Im folgenden werden diese Grundlagen erläutert und der Ausgangspunkt bestimmt. Darauf aufbauend werden in Abschnitt 4 die Arbeitsziele spezifiziert.

3.1 Anspruch

Idealerweise sollten sich Vorhersagen und Beurteilungen der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen auf detaillierte Kenntnisse der Aufnahme, Verteilung und Elimination sowie der molekularen Wirkmechanismen und der Wirkungsweisen von Mischungskomponenten in aquatischen Organismen stützen, und sie müßten darüberhinaus vor allem auch Wirkketten auf ökosystemarer Ebene berücksichtigen. Derartige Kenntnisse sind für die weitaus größte Zahl der Umweltchemikalien nicht vorhanden und werden auch in einem absehbaren Zeitraum nicht verfügbar werden. Für regulatorische Zwecke müssen deshalb pragmatischere Lösungsansätze gefunden werden, die sich auf einfache Hypothesen stützen, die dennoch aber durch den Stand des Wissens hinreichend begründet sind. Ein pragmatischer Ansatz bedeutet dabei die Orientierung auf das Erkennen regelmäßiger Zusammenhänge, im Gegensatz zur Erforschung der Besonderheiten von Einzelfällen. Es geht darum, ein Handeln unter Ungewißheit zu ermöglichen, das den Ansprüchen des Vorsorgeprinzips im Umweltschutz dort hinreichend Rechnung tragen läßt, wo aus technischen oder wirtschaftlichen Gründen die Ausbreitung von Chemikalien in der Umwelt nicht für verhinderbar oder ihre Herstellung und ihr Einsatz für unverzichtbar gehalten werden.

Qualitative und quantitative Wirkungsveränderungen

Die biologische Wirkung einer Umweltchemikalie kann durch die Anwesenheit einer oder mehrerer weiterer Substanzen in qualitativer oder quantitativer Weise verändert werden. Eine qualitative Veränderung der Wirkeigenschaften wäre z.B. dann gegeben, wenn die Komponenten eines Gemisches alleine jeweils keine kanzerogene Wirkung zeigen, in Kombination aber die Entstehung eines Tumors zu induzieren vermögen. Solche qualitativen Wirkungsveränderungen waren nicht Gegenstand dieses Vorhabens und können durch die geprüften Vorhersage-Konzepte auch nicht prognostiziert werden. Das Projekt

Teile dieses Abschnitts fassen vorhabenrelevante Aspekte folgender Arbeiten zusammen: Bödeker et al. 1992, Altenburger et al. 1993, Grimme et al. 1994, 1996a, 1996b, Faust et al. 1996

hat sich vielmehr auf Veränderungen der Intensität eines vorgegebenen Effektes konzentriert, die durch die gleichzeitige Anwesenheit mehrerer Schadstoffe hervorgerufen werden. Es ging also um toxische Effekte, die bei ausreichend hoher Konzentration und geeigneten Bedingungen auch durch jede der Einzelsubstanzen eines Gemisches induziert werden können.

Integrale Parameter

Im Fokus dieses Projektes, wie auch der gewässertoxikologischen Prüfung von Chemikalien generell, stehen sog. *integrale Parameter*. Beispiele dafür sind die Sterblichkeitsrate oder die Vermehrungsrate einer Population von Organismen, Parameter also, die durch nahezu jede Substanz beeinträchtigt werden können. Es wird erwartet, daß die unterschiedlichsten Mechanismen der Wirkung einzelner Schadstoffe auf dieser Beobachtungsebene gemeinsam zum Tragen kommen. Qualitative Veränderungen von Wirkeigenschaften sollten also in einem solchen *gemeinsamen toxikologischen Endpunkt* auch einen quantitativen Niederschlag finden.

Konzentrations-Wirkungsanalytik

Klassische Vorgehensweise der Toxikologie bei der Charakterisierung der Giftigkeit von Substanzen ist die Bestimmung von *Konzentrations-* oder *Dosis-Wirkungsbeziehungen*. Dabei wird die biologische Wirkung als Funktion der einwirkenden Stoffmenge bestimmt, während alle anderen Einflußgrößen konstant gehalten werden. Als Graph dieser Funktion erhält man eine 2-dimensionale *Konzentrations-Wirkungskurve*. Überträgt man diesen Ansatz auf die möglichen Kombinationen von zwei Substanzen, erhält man eine *Konzentrations-Wirkungsfläche* im 3-dimensionalen Raum. Bei einem multiplen Gemisch aus n Stoffen gelangt man schließlich zu einer Konzentrations-Wirkungsfläche in einem Raum mit $n+1$ Dimensionen. Damit überschreitet man menschliche Vorstellungs- und Interpretationsfähigkeiten. Eine Reduktion auf eine einfache 2-dimensionale Konzentrations-Wirkungskurve ist jedoch möglich. Entweder wird lediglich die Konzentration einer einzigen Substanz variiert, während die Konzentrationen aller anderen Mischungskomponenten konstant gehalten werden. Oder aber das Verhältnis der Mischungskomponenten bleibt konstant, und nur die Gesamtkonzentration variiert. Der letztgenannte Ansatz wurde in den experimentellen Arbeiten dieses Vorhabens realisiert.

Der Kern des wissenschaftlichen Problems dieses Vorhabens lag nun darin, solche experimentell bestimmten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von multiplen Gemischen in Relation zu den Konzentrations-Wirkungsfunktionen der Einzelstoffe zu setzen. Handelt es sich um ein singuläres Phänomen, das nur für das getestete Gemisch unter den gegebenen Bedingungen beobachtet werden kann? Oder aber gibt es einen regelhaften Zusammenhang zwischen Einzelstoff-Toxizität und Mischungstoxizität, der für prognostische Zwecke genutzt werden kann? Solche allgemeingültigen Relationen werden unter Zugrundelegung bestimmter pharmakologischer Annahmen durch *Vorhersage-Konzepte* formuliert. Sie spielen deshalb eine zentrale Rolle in diesem Vorhaben, wie auch in der wissenschaftlichen Diskussion um Kombinationswirkungen überhaupt.

3.2 Vorhersage-Konzepte

Effekt-Summation

In Zusammenhang mit Kombinationswirkungen wird häufig davon gesprochen, daß Effekte von Kombinationen größer oder geringer seien als die *Summe der Einzeleffekte*. Ohne nähere Begründung wird damit implizit ausgedrückt, daß die arithmetische Summe der Einzeleffekte eine rationale Erwartung für den Gesamteffekt eines Gemisches darstelle. Die eingängige Formulierung von der *Summe der Einzeleffekte* mag zwar intuitiv plausibel erscheinen. Bei näherer Betrachtung zeigen sich aber gravierende Mängel dieses Ansatzes. So macht schon die Tatsache stutzig, daß sich für die Kombination von 10 Stoffen, die, bezogen auf einen bestimmten Parameter, beispielsweise jeweils 20 % Hemmung hervorrufen, rechnerisch zusammen 200 % Hemmung ergeben sollen. Auch das Gedankenexperiment einer Kombination von Agenzien, die in Wirklichkeit nur unterschiedliche Verdünnungen ein und desselben Stoffes sind, in der Literatur unter dem Stichwort "*Sham Combination*" bekannt, führt zu dem Schluß, daß Effekt-Summation allenfalls in dem speziellen Fall linearer Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zu erwarten wäre (s. Reif 1984, Berenbaum 1985).

Abgesehen von diesem und anderen theoretischen Sonderfällen (s. Plackett und Hewlett 1948) führen die bisher entwickelten pharmakologischen und biometrischen Vorstellungen über das Zusammenwirken von Stoffen nicht zur Effekt-Summation (s. Berenbaum 1981, 1989). Nur die Konzepte der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG werden nach Stand des Wissens als allgemein begründet angesehen (s. Greco et al. 1992). Nichtsdestoweniger ist die Erwartung einer simplen Addition von Effekten vielen experimentellen Arbeiten zugrunde gelegt worden und hat Eingang in toxikologische Standard-Lehrbücher gefunden. Dabei wird Effekt-Summation häufig auch als *Additivität* bezeichnet, woraus sich erhebliche Verwechslungsmöglichkeiten ergeben.

KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT

Das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT geht wesentlich auf Arbeiten des Pharmakologen Loewe zurück (Loewe und Muischnek 1926, Loewe 1927, 1953). Dem Konzept liegt die Vorstellung einer "*Similar Action*" von Mischungskomponenten zugrunde (s. Bliss 1939, Plackett und Hewlett 1952). Die Überlegungen zur Formulierung dieses Konzeptes gingen von der bereits erwähnten sog. *sham combination* aus, d.h. der Kombination einer Substanz mit sich selbst. In allgemeinsten Formulierung bezeichnet KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT das Phänomen, daß sich eine Substanz in bezug auf den untersuchten Wirkparameter wie die Verdünnung einer anderen verhält. Im einfachsten Fall heißt dies, daß die kombinierten Substanzen parallele Konzentrations-Wirkungskurven aufweisen und sich nur in ihrer relativen Wirksamkeit unterscheiden. Im engeren, mechanistischen Sinne wird KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT als gegeben angenommen, wenn sich Substanzen durch einen identischen molekularen Wirkungsmechanismus und eine ähnliche Wirkungsweise auszeichnen. Im Falle von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT bleibt der Effekt eines Stoffgemisches konstant, wenn eine Mischungskomponente ganz oder teilweise durch die entsprechende Fraktion der gleich wirksamen (sog. äqui-effektiven)

Konzentration einer anderen Substanz ersetzt wird. Die mathematische Formulierung dieses Konzepts ist in Abb. 3.1 angegeben.

Wissenschaftlicher Konsens besteht darin, daß KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT ein geeignetes Konzept für die Prognose der Mischungstoxizität von Stoffen mit *ähnlicher* Wirkung darstellt (DFG 1975, EIFAC 1980, 1987, EPA 1986, vergl. Altenburger et al. 1993). KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT ist darüberhinaus aber auch als "*General Solution*" der Kombinationswirkungs-Analyse propagiert worden (s. Berenbaum 1985). Demnach stellt dieses Konzept auch für die Vorhersage und Beurteilung von Kombinationen *unähnlich* wirkender Substanzen eine valide Grundlage dar. Die Tragfähigkeit der dafür vorgebrachten Argumente wird allerdings von einem Teil der Expertenschaft vehement bestritten (s. Pöch 1991, Chou und Rideout 1991). Überzeugende Ansätze zur Überwindung dieser Kontroverse sind derzeit nicht in Sicht (s. Greco et al. 1992).

UNABHÄNGIGE WIRKUNG

Das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG wurde erstmals von Bliss (1939) unter dem Begriff "*Independent Joint Action*" formuliert. Im Gegensatz zur KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT geht es von der Annahme einer *unähnlichen* Wirkung der Substanzen in einem Gemisch aus. *Unähnlich* meint die primäre Interaktion mit unterschiedlichen Wirkorten und die Auslösung eines gemeinsamen Effektes über unterschiedliche Wirkketten. Es wird postuliert, daß unter diesen Bedingungen der relative Effekt einer Substanz (z.B. 50 % Hemmung gegenüber einer sonst gleich behandelten Kontrolle) in Gegenwart einer zweiten Substanz unverändert bleibt. Die mathematische Formulierung dieses Sachverhalts ist in Abb. 3.1 angegeben. Ihre Bedeutung sei am Beispiel von zwei Mischungskomponenten erläutert, die alleine jeweils den Tod von 50 % der Organismen einer Versuchspopulation hervorrufen: 50 % Sterblichkeit in einer bereits um 50 % dezimierten Population bedeuten eine Erhöhung der Rate um $0.5 \times 0.5 = 25\%$ auf 75 %.

Angezweifelt wird die Angemessenheit des Konzeptes UNABHÄNGIGER WIRKUNG insbesondere auf der Ebene integraler Effekte in komplexen Systemen, wie ganzen Zellen, Organismen oder Populationen von Organismen (s. Greco et al. 1992) und unter Bedingungen chronischer Exposition (EIFAC 1987). Kann der idealtypischen Vorstellung von Wirkketten, die völlig unabhängig zu einem gemeinsamen toxikologischen Endpunkt führen, mehr als nur theoretische Bedeutung beigemessen werden? Lassen die vernetzte Organisation des Stoffwechsels, die Existenz von Rückkopplungsschleifen und Kompensationsreaktionen und die hierarchischen Abhängigkeiten von Entwicklungsschritten sich mit dem Konstrukt der *Unabhängigkeit* in Einklang bringen? Sogar die Exreposition, daß *Unabhängigkeit* nur ein unter bestimmten Bedingungen geltender Spezialfall der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT sei, hat viel Unterstützung gefunden (Berenbaum 1985, Sühnel 1990).

Beurteilung

Ist der gemessene Effekt eines Stoffgemisches größer, gleich oder geringer als aufgrund der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der einzelnen Komponenten zu erwarten wäre? Dies ist eine zentrale Frage bei der quantitativen Analyse und Beurteilung von

Kombinationswirkungen. Die Vorhersage-Konzepte liefern Maßstäbe für die Entscheidung dieser Frage. Abweichungen von Erwartungswerten werden meist mit den Begriffen "Synergismus" (größer als erwartet) und "Antagonismus" (geringer als erwartet) charakterisiert. Diese Begriffe bestimmen oft die Diskussion um Kombinationswirkungen. Wichtig ist deshalb festzustellen, daß ihr Aussagewert vom eindeutigen Bezug auf ein zugrundegelegtes Beurteilungskonzept abhängt.

Der Umstand, daß strittig ist, welches der genannten Konzepte je nach Art des Substanzgemisches, des Toxizitätsparameters und der Einwirkungsbedingungen die angemessene Annahme darstellt, kann in ein Beurteilungsdilemma führen: Abweichungen können beispielsweise *synergistisch* gegenüber UNABHÄNGIGER WIRKUNG, aber *antagonistisch* gegenüber KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT ausfallen. Auch erlaubt die Übereinstimmung experimenteller Daten mit Vorhersagewerten nach dem einen oder anderen Konzept nicht

Konzentrations-Additivität	
<i>binäres Gemisch</i>	$\frac{c_{S1}}{EC_x(S1)} + \frac{c_{S2}}{EC_x(S2)} = 1$
<i>multiples Gemisch</i>	$\sum_{i=1}^n \frac{c_{Si}}{EC_x(Si)} = 1$
Unabhängige Wirkung	
<i>binäres Gemisch</i>	$E(c_{S1}+c_{S2}) = E(c_{S1}) + E(c_{S2}) - E(c_{S1}) \cdot E(c_{S2})$
<i>multiples Gemisch</i>	$E(c_{S1}+c_{S2}+ \dots +c_{Sn}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_{Si})]$

Abb. 3.1: Mathematische Formulierung von Vorhersagekonzepten für die Toxizität von Gemischen

c bezeichnet die Konzentrationen der Substanzen S1 bis Sn, E die betrachteten Effekte und EC_x die Konzentrationen, die erforderlich sind, um einen bestimmten Effekt x hervorzurufen (z.B. EC₅₀).

den sicheren Rückschluß auf das Zutreffen der zugrundegelegten Annahmen *ähnlicher* oder *unähnlicher* Wirkung (Bödeker et al. 1992, Grimme et al. 1994). Eine ernste Hürde stellt dieses Beurteilungsdilemma bei klassisch pharmakologischer Zielsetzung der Kombinations-Wirkungsanalyse dar, nämlich der mechanistischen Interpretation beobachteter Kombinationseffekte. Unter der Zielsetzung einer prospektiven ökotoxikologischen Beurteilung kann die Entscheidung für oder gegen eines der Konzepte jedoch nach handlungsorientierten Gesichtspunkten getroffen werden: Welches Konzept liefert die genaueren und unter Vorsorgegesichtspunkten vor allem sichereren Vorhersagen und sollte deshalb zur Grundlage regulatorischer Maßnahmen gemacht werden?

Modelle

In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Methoden und Modellen, die die Vorhersage-Konzepte in mathematische oder statistische Verfahren der praktischen Datenauswertung umsetzen. Sie können nach Ursprung, Zielsetzung, Voraussetzungen und mathematischen Gesichtspunkten unterschiedlich gruppiert werden. Übersichten finden sich bei Berenbaum 1989, Bödeker et al. 1990, Kodell und Pounds 1991, Grimme et al. 1994. *Effect Multiplication*¹ und *Joint Independent Action*² sind Beispiele solcher Modelle, die auf dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG basieren. *Isobolographie*³, *Toxic Unit Summation*⁴, *Additivity Index*⁵, und *Simple Similar Action*⁶ sind entsprechend als wichtige Umsetzungen der Hypothese *konzentrations-additiver* Wirkung zu nennen. Einige Modelle, wie der *Mixture Toxicity Index*⁷ oder das *Median Effect Model*⁸ zielen zwar ebenfalls auf die Detektion von Abweichungen gegenüber KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT, benutzen dazu aber noch weitere, spezielle Bezugspunkte. Manche dieser Verfahren, wie z. B. die Isobolographie, sind ausschließlich auf den Fall binärer Gemische anwendbar und damit für dieses Vorhaben ungeeignet. Insoweit von anderen Gebrauch gemacht wird, werden sie in Abschnitt 6.3 erläutert. Im wesentlichen aber greift dieses Projekt auf die Konzepte nur in ihrer ursprünglichen, in Abb. 3.1 angegebenen Form zurück.

Terminologie

Für beide Konzepte, KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, sind in unterschiedlichen Wissenschaftsgebieten von verschiedenen Autoren zahlreiche unterschiedliche Begriffe verwendet worden. UNABHÄNGIGE WIRKUNG ist beispielsweise auch als *Funktioneller Synergismus*⁹, *Simple Independent Action*¹⁰, *Multiplicative Survival Model*¹¹, *Effekt Multiplikation*¹², *Response Addition*¹³, *Response Multiplication*¹⁴ und sogar als *Effekt Summation*¹⁵ bezeichnet worden. Ein ebensolches Begriffs-Wirrwarr herrscht bei der Bezeichnung von Übereinstimmungen oder Abweichungen von Kombinationseffekten mit Vorhersagewerten (s. Bödeker et al. 1992). Besonders verwirrend wirkt dabei, daß nicht nur ein und derselbe Sachverhalt unterschiedlich bezeichnet wird, sondern daß auch ein und derselbe Begriff für unterschiedliche, zum Teil gegensätzliche Situationen verwendet wird. Zur Eindämmung der Konfusion ist von einer interdisziplinären internationalen Arbeitsgruppe ein terminologischer Konsens für das Zusammenwirken von zwei Agenzien vorgeschlagen worden (Greco et al. 1992). Prinzip dieser Terminologie ist es,

¹ Colby 1967, ² Plackett & Hewlett 1948, ³ Loewe & Muischnek 1926, ⁴ Sprague 1970, ⁵ Marking 1977, ⁶ Bliss 1939, ⁷ Königmann 1981, ⁸ Chou & Talalay 1983, ⁹ Ariëns et al. 1956, ¹⁰ Finney 1971a, ¹¹ Morse 1978, ¹² Berenbaum 1981, ¹³ Anderson & Weber 1975, ¹⁴ Christensen & Chen 1985, ¹⁵ Gessner 1988

Vorhersage-Konzepte durch Voranstellen der Namen von Erst-Autoren zu spezifizieren und Beurteilungen eindeutig auf ein zugrundegelegtes Konzept zu beziehen. KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT soll danach als *Loewe Additivity*, UNABHÄNGIGE WIRKUNG als *Bliss Independence* bezeichnet werden. Kombinationseffekte, die den jeweiligen Vorhersagewert übersteigen, werden als *Loewe Synergism* bzw. *Bliss Synergism* gekennzeichnet. Im gegenteiligen Fall soll von *Loewe Antagonism* bzw. *Bliss Antagonism* gesprochen werden. Dem Vorteil der Eindeutigkeit dieser Terminologie steht der Nachteil ihrer bisherigen Ungebräuchlichkeit gegenüber. Zugunsten von Begriffen, die in der aquatischen Toxikologie etabliert sind (vergl. EIFAC 1987, Calamari und Vighi 1992, Altenburger et al. 1993), sprechen wir in diesem Bericht deshalb von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT (engl. *Concentration Addition*) im Sinne von *Loewe Additivity* und von UNABHÄNGIGER WIRKUNG (engl. *Independent Action*) im Sinne von *Bliss Independence*.

Effekte und Effekt-Konzentrationen

UNABHÄNGIGE WIRKUNG und KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT operieren mit unterschiedlichen Arten von Toxizitätswerten, nämlich einerseits Effekten und andererseits Effekt-Konzentrationen¹. Sind die relativen Effekte einzeln applizierter Mischungskomponenten bekannt, kann daraus nach dem UNABHÄNGIGKEITS-Konzept die Stärke des Gesamteffektes prognostiziert werden. Die Kalkulation von Vorhersagen auf Basis von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT setzt hingegen die Kenntnis von Effekt-Konzentrationen voraus, erfordert also eine zumindest partielle Bestimmung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen jeder Einzelsubstanz. Bei gegebenem Mischungsverhältnis der Komponenten liefert das Konzept diejenige Gesamtkonzentration, die einen vorgegebenen Effekt erwarten läßt, also eine Effektkonzentration für das Gemisch (s. 6.3.2). Will man die beobachtete Toxizität eines Gemisches mit den Erwartungswerten beider Konzepte vergleichen, muß deshalb zunächst eine einheitliche Vergleichsebene hergestellt werden. Dies gelingt, indem man die Formeln für die Konzepte mit den Konzentrations-Wirkungsfunktionen der Einzelsubstanzen und dem Mischungsverhältnis der Komponenten verknüpft. Das primäre Resultat sind vergleichbare lokale Vorhersagen, d.h. für bestimmte Effekte oder Effekt-Konzentrationen. Das Ziel globaler Prognosen, d.h. des gesamten Verlaufs der Konzentrations-Wirkungskurve, wird bei beiden Konzepten erst durch die iterative Kalkulation von Erwartungswerten für viele Effektniveaus erreicht. In jedem Falle werden diese prognostizierten Kurven der Mischungstoxizität durch die statistische Schätzung der Konzentrations-Wirkungsfunktionen der Einzelstoffe determiniert (s. 6.3.2).

Quantitative Relationen

Beide Konzepte lassen erwarten, daß der Effekt einer Kombination von Stoffen, die jeweils in biologisch wirksamen Konzentrationen vorliegen, stets größer ausfällt als der der einzeln applizierten Mischungskomponenten. Mischungskomponente meint dabei einen Einzelstoff in der im Gemisch vorliegenden Einzelkonzentration.

¹ Effekt-Konzentrationen EC_x bezeichnen diejenige Konzentration C eines Stoffes, bei der die Intensität oder Häufigkeit eines Effektes E ein bestimmtes Effektniveau x erreicht (z.B. EC_{50} = Konzentration, die 50 % des Maximaleffektes auslöst). Sie werden aus experimentellen Daten statistisch geschätzt.

Trägt man die Wirkungen von Einzelstoffen und Gemischen auf einer einheitlichen Skala jeweils gegen die vorliegende Gesamt-Stoffkonzentration auf, so prognostiziert KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT eine Kurve, die zwischen den Kurven der Einzelstoffe mit der höchsten und der geringsten Toxizität liegt. Wo jeweils genau, das hängt vom Mischungsverhältnis der Komponenten ab. Auf der Ebene von Effekt-Konzentrationen sagt dieses Konzept also stets intermediäre Werte zwischen den Extrema der beteiligten Einzelstoffe voraus. Effekt-Konzentrationen jenseits dieser Grenzen sind in jedem Falle unerwartet.

Für Vorhersagen nach dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG kann diese Aussage nicht in gleicher Absolutheit getroffen werden. Da das Konzept nicht mit Effekt-Konzentrationen, sondern mit Effekten operiert, kann eine allgemein gültige Eingrenzung des Bereichs, in dem Erwartungswerte liegen, auch nur auf dieser Ebene formuliert werden. Der Blick auf die Formel (Abb. 3.1) zeigt, daß der prognostizierte Gesamt-Effekt einer Kombination wirksamer Komponenten stets zwischen dem größten Einzeleffekt und der Summe der Einzeleffekte liegt.

Welches der beiden Konzepte die höhere Mischungstoxizität prognostiziert, d.h. die niedrigere Effektkonzentration, wird von drei Faktoren bestimmt: dem betrachteten Effektniveau, der Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven der Einzelstoffe und den zu ihrer Schätzung verwendeten biometrischen Modellen (Drescher und Boedeker 1995). Unter den gewässertoxikologisch besonders relevanten Bedingungen steiler Konzentrations-Wirkungskurven und niedriger Effektkonzentrationen der Einzelstoffe läßt KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT im allgemeinen eine höhere Toxizität des Gemisches erwarten als UNABHÄNGIGE WIRKUNG (Abb. 3.2). Für regulative Zwecke kann KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT deshalb als "*reasonable worst case estimation*" gewertet werden (Boedeker et al. 1993). Im experimentellen Einzelfall stellen sich die Relationen zwischen beiden Vorhersagen allerdings zuweilen komplizierter dar: es treten Überschneidungen zwischen den Kurven auf. Beispiele dafür finden sich bei Grimme et al. 1994.

3.3 NOEC's

Besondere Brisanz gewinnen die quantitativen Differenzen zwischen den Vorhersagen der Mischungstoxizität nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG unter der Bedingung, daß die Komponenten eines Gemisches jeweils in Konzentrationen vorliegen, die alleine nur einen geringen, statistisch nicht signifikanten oder im verwendeten Test gar nicht erkennbaren Effekt hervorrufen. Die Unterschiede können dann fundamental oder zumindest drastisch sein, und die Entscheidung für oder gegen eines der beiden Konzepte als Grundlage prospektiver Risikoabschätzungen gewinnt eine enorme Tragweite. Dieser Umstand ist für die Zielsetzung des Projektes von zentraler Bedeutung.

No Effect Concentrations (NEC's)

Die Annahme der Existenz von Wirkungsschwellen, d.h. von Konzentrationen unterhalb derer Substanzen keinen toxischen Effekt hervorrufen, sog. *No Effect Concentrations*, spielt eine zentrale Rolle in der gegenwärtigen Praxis der Riskobewertung von Umweltchemikalien (s. European Commission 1996). Nimmt man folglich den Fall an, daß die Effekte von Mischungskomponenten in den vorliegenden Konzentrationen *Null* seien und betrachtet dazu die Formel für das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG (Abb. 3.1), so ergibt sich daraus kein erwartbarer Beitrag zur Gesamtoxizität des Gemisches: Die Addition bzw. Multiplikation von *Null*-Effekten ergibt immer nur *Null*.

Ganz andere Prognosen liefert hingegen die Hypothese *konzentrations-additiven* Zusammenwirkens. Da Mischungskomponenten hierbei nicht mit ihren Einzel-Effekten, sondern als Bruchteile von Einzel-Effektkonzentrationen verrechnet werden, trägt jeder Stoff in jeder Konzentration mehr oder weniger stark zur Gesamtwirkung eines Gemisches bei. Dies ergibt sich aus der theoretischen Grundüberlegung zur "*sham combination*" einer Substanz mit sich selbst (s. 3.2): Die wirksame Menge eines Stoffes kann in noch so viele und noch so kleine Portionen zerlegt werden, zusammengenommen und gleichzeitig einwirkend ergibt sich doch wieder der gleiche toxische Gesamteffekt.

Sofern die Exposition gegenüber Schadstoffen unterhalb der postulierten NEC's von Einzelstoffen gehalten werden kann, ergeben sich aus den Konzepten also gegensätzliche Schlußfolgerungen: Die Annahme von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT erfordert zwingend die Berücksichtigung möglicher Kombinationswirkungen in der Risikobewertung. Die Annahme UNABHÄNGIGER WIRKUNG kann hingegen einen umweltpolitischen Regelungsbedarf verneinen lassen.

No Observed Effect Concentrations (NOEC's)

Als Versuch der Approximation einer vermuteten NEC werden aus Daten toxikologischer Untersuchungen sog. *No Observed Effect Concentrations (NOEC)* abgeleitet, typischerweise definiert als die höchste getestete Konzentration, bei der der beobachtete Toxizitätsparameter noch nicht statistisch signifikant vom Kontrollwert abweicht (s. z.B. EPA 1991, Van Leeuwen und Hermens 1995, Van der Hoeven, Noppert und Leopold 1997). In den üblicherweise verwendeten ökotoxikologischen Testverfahren können Effekte unterhalb von 10 % meist nicht mehr als statistisch signifikant detektiert werden. In der Regel liegt die Sensitivitätsschwelle zwischen 10 und 30 % (Moore und Caux 1997). Sie ist abhängig von der experimentellen und biologischen Varianz, der Anzahl und Abstufung von Testkonzentrationen sowie der Anzahl von Replikaten und Kontrollen: je schlechter die Datenlage, desto höher die NOEC (s. Bruce und Versteeg 1992, Hoekstra und Van Ewijk 1993, Pack 1993).

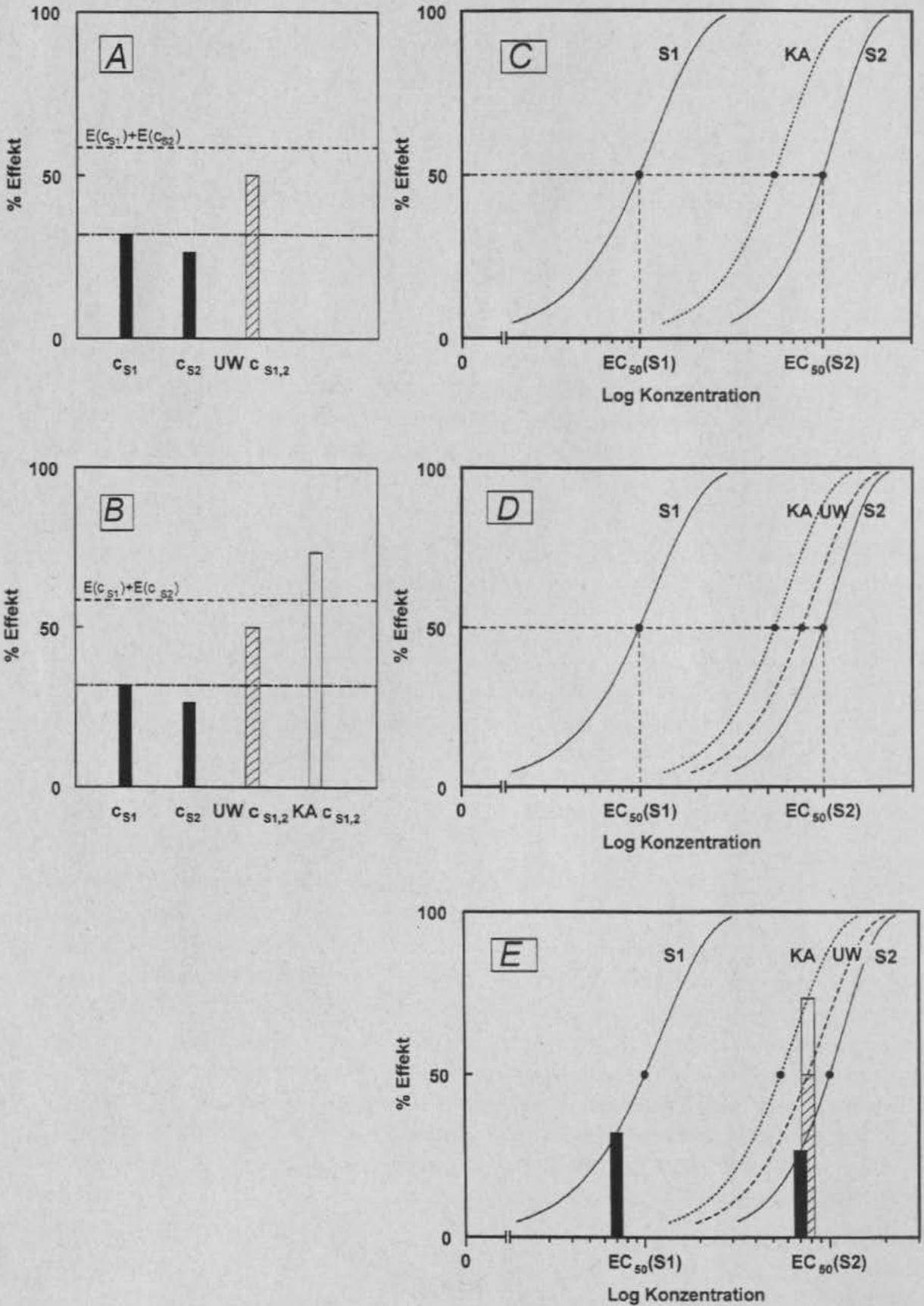


Abb. 3.2: Typische Relationen zwischen Einzelstoff-Toxizität und Erwartungswerten für die Toxizität von Gemischen

Legende zu Abb. 3.2:

Auf Grundlage theoretischer Überlegungen (Drescher und Bödeker 1995) und experimenteller Daten (Grimme et al. 1994) können bestimmte Relationen zwischen Einzelstoff-Toxizität und Erwartungswerten für die Toxizität von Gemischen als *typisch* bezeichnet werden. Sie gelten für den gewässertoxikologisch besonders relevanten Fall relativ steiler Konzentrations-Wirkungskurven und niedriger Effekt-Konzentrationen von Einzelsubstanzen (s. Bödeker et al. 1993). Dargestellt sind diese *typischen* Relationen für ein binäres Gemisch aus den angenommenen Substanzen S1 und S2. Sie gelten entsprechend für den Fall multipler Gemische, sofern S1 und S2 jeweils diejenigen Einzelsubstanzen mit der höchsten bzw. geringsten Toxizität repräsentieren.

A Vorhersage von Effekten nach dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG (UW)

Voraussetzung ist die Kenntnis der Einzel-Effekte (■) von Mischungskomponenten (c_{S1} , c_{S2}), d.h. definierten Substanzen (S1, S2) in definierten Konzentrationen c . Kalkuliert wird ein Erwartungswert für den Gesamt-Effekt (⊗) der gemeinsam einwirkenden Komponenten (UW $c_{S1,2}$) mit der Gesamtkonzentration $c_{S1,2} = c_{S1} + c_{S2}$. Dieser Erwartungswert ist stets größer als der größte Einzeleffekt (----) und kleiner als die Summe der Einzeleffekte (-----). Im dargestellten Beispiel beträgt er 50 %.

B Vergleich von Vorhersagewerten auf der Ebene von Effekten

Dem nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG erwarteten Effekt (UW $c_{S1,2}$) kann ein vergleichbarer Erwartungswert unter der Hypothese *konzentrations-additiven* Zusammenwirkens (KA $c_{S1,2}$) gegenübergestellt werden. Für dessen Kalkulation genügt jedoch nicht die Kenntnis der Effekte der Einzelsubstanzen (■) in den jeweils im Gemisch vorliegenden Konzentrationen (c_{S1} , c_{S2}). Vielmehr müssen Konzentrations-Wirkungsfunktionen der Einzelstoffe bestimmt sein. Im *typischen* Falle ist der nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT zu erwartende Effekt des Gemisches (□) größer als nach UW (⊗) und auch größer als die Summe der Einzeleffekte (-----).

C Vorhersage von Effekt-Konzentrationen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT (KA)

Voraussetzung ist die Kenntnis von Einzelsubstanz-Konzentrationen, die den gleichen Effekt hervorrufen (• S1, • S2). Im dargestellten Beispiel sind es die EC_{50} -Werte ($EC_{50}(S1)$, $EC_{50}(S2)$). Kalkuliert wird die entsprechende Effekt-Konzentration eines Gemisches (• KA), das die Einzelsubstanzen in einem definierten Verhältnis ($c_{S1} : c_{S2}$) enthält. Abgebildet ist der Fall, daß dieses Mischungsverhältnis gerade dem Verhältnis der EC_{50} -Werte der Einzelsubstanzen entspricht. Die nach KA zu erwartende Effekt-Konzentration liegt stets zwischen den äquivalenten Effekt-Konzentrationen der Einzelsubstanzen.

Die Kenntnis der Effekt-Konzentrationen von Einzelsubstanzen impliziert die, zumindest partielle, Kenntnis von Konzentrations-Wirkungskurven (—S1, —S2). Soweit deren Funktionen bestimmt sind, kann, innerhalb des Gültigkeitsbereichs, auch für jedes andere Effektniveau die zugehörige Effekt-Konzentration eines Gemisches vorhergesagt werden. Es ergibt sich der Graph einer zu erwartenden Konzentrations-Wirkungskurve für ein Gemisch mit konstantem Mischungsverhältnis (.....KA).

D Vergleich von Vorhersagewerten auf der Ebene von Effekt-Konzentrationen

Nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT erwartete Effekt-Konzentrationen (.....KA) können wiederum mit entsprechenden Erwartungswerten nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG (---•---UW) verglichen werden. Deren Kalkulation setzt voraus, daß Konzentrations-Wirkungsfunktionen der Einzelsubstanzen bestimmt sind und die im Gemisch vorliegenden Einzelstoff-Konzentrationen auch in dem als gültig erachteten Bereich dieser Funktionen liegen. Im *typischen* Falle sind die nach UW erwarteten Effekt-Konzentrationen höher als nach KA, d.h. die prognostizierte Toxizität ist geringer.

E Zusammenführung der Betrachtungsweisen

Zur Veranschaulichung der Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Betrachtungsweisen (Effekte und Effekt-Konzentrationen) kann Abb. B in Abb. D integriert werden. Voraussetzung ist, daß das Konzentrations-Verhältnis der Mischungskomponenten ($c_{S1} : c_{S2}$) in Abb. A und B dem Mischungsverhältnis entspricht, für das in Abb. C und D die zu erwartenden Kurvenverläufe der Mischungstoxizität (.....KA, ---UW) dargestellt sind ($c_{S1} : c_{S2} = EC_{50}(S1) : EC_{50}(S2)$). Die in Abb. A und B dargestellten Effekte liegen dann auf den in C und D abgebildeten Konzentrations-Wirkungskurven.

NOEC's repräsentieren also keine *No Effect Concentrations*, sondern bezeichnen Konzentrationen, für die niedrige Effekte weder quantifiziert noch ausgeschlossen werden (s. Skalski 1981). Für Vorhersagen der Toxizität multipler Gemische unter der Hypothese UNABHÄNGIGER WIRKUNG macht es jedoch einen entscheidenden Unterschied, ob einzelne Mischungskomponenten tatsächlich keinen Effekt hervorrufen, oder ob es sich um einen zwar nur geringen und statistisch nicht signifikanten, aber gleichwohl real vorhandenen Effekt handelt: 70 Stoffe mit Null-Effekt ergeben nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG auch zusammen keinen Effekt, 70 Stoffe mit jeweils 1 % Wirksamkeit lassen hingegen einen 50-prozentigen Schaden erwarten.

Für die Prognose von Mischungstoxizitäten nach dem Konzept UNABHÄNGIGE WIRKUNG und die experimentelle Validierung dieser Vorhersagen sind NOEC-Werte somit ungeeignet. Die durch NOEC's markierte Grauzone niedriger Effektkonzentrationen muß dazu in anderer Weise operationalisiert werden.

Benchmark Concentrations

Harsche, vor allem statistisch begründete Kritik hat zu einer starken Tendenz der Abkehr vom NOEC-Verfahren in der Risikobewertung geführt (s. European Commission 1996, S. 327, Chapman, Caldwell und Chapman 1996, Van der Hoeven, Noppert und Leopold 1997). Unter den diskutierten Alternativen ist für dieses Projekt die Bestimmung einer "EC_x" (Pack 1993) oder "Benchmark Concentration" (Crump 1984, 1995)¹ von Bedeutung. Gemeint ist eine niedrige, festzusetzende Effektkonzentration². Sie wird aus experimentellen Daten statistisch geschätzt (s. Sebaugh et al. 1991, Bruce und Versteeg 1992, Crump 1995, Caux und Moore 1997).

Im Gegensatz zur NOEC-Bestimmung nutzt die "Benchmark"-Bestimmung die gesamte vorhandene Information über den Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve. Sie führt zu definitiven Effekt-Konzentrationen, die zudem mit einer Angabe der statistischen Unsicherheit versehen werden können. Die Werte sind damit für die Prognose und Analyse von Kombinationswirkungen mit beiden Konzepten, UNABHÄNGIGE WIRKUNG und KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT, verwendbar.

Je niedriger die gesetzte *Benchmark*-Konzentration, desto höher sind die Anforderungen an das Datenmaterial und an die statistische Analyse. Als Standard-Kenngrößen für die Ablösung des NOEC in der Risikobewertung werden EC₀₅ und EC₁₀ diskutiert (s. Van der Hoeven, Noppert und Leopold 1997). Darüberhinausgehender Anspruch dieses Vorhabens war es, die Kombinations-Wirkungsanalyse in Konzentrationsbereiche von Mischungskomponenten voranzubringen, die deutlich unterhalb konventionell bestimmter NOEC-Werte liegen. Als Leitpunkt der Projektkonzeption wurde dazu eine "Benchmark" von 1 % gesetzt (EC₀₁).

¹ Der Begriff wurde von Crump als "Benchmark Dose" in die humantoxikologische Literatur eingeführt. Im Kontext der aquatischen Toxikologie verwenden wir hier entsprechend den Begriff *Benchmark Concentration* (vergl. Bruce & Versteeg 1992).

² In der Humantoxikologie wird *Benchmark Dose* meist noch spezifischer definiert, nämlich als "statistical lower confidence limit on the dose estimated to produce a predetermined level of change in response (the benchmark response - BMR) relative to controls" (EPA 1996)

Anders als im Falle tatsächlicher *No Effect Concentrations* ergeben sich bei solch niedrigen Effekt-Konzentrationen zwar keine prinzipiellen Unterschiede zwischen den Prognosen nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG und KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT, die quantitativen Differenzen können aber immerhin erheblich sein. Als Gedankenexperiment nehme man 10 Substanzen mit steilen Konzentrations-Wirkungskurven, bei denen 1/10 der jeweiligen EC_{50} -Konzentration Einzeleffekte von jeweils 1 % hervorruft. Liegen diese EC_{01} -Konzentrationen zusammen in einem Gemisch vor, läßt UNABHÄNGIGE WIRKUNG einen Gesamteffekt von nur 9 %, KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT hingegen von 50 % prognostizieren. Für die Projektkonzeption folgt daraus, daß sich das "Design" von Experimenten zur multiplen Mischungstoxizität so gestalten läßt, daß eine hohe Diskriminanz zwischen den Vorhersagewerten erreicht wird und die Ergebnisse eindeutige Aussagen über den Prognosewert der Konzepte erwarten lassen.

3.4 Wirkungs-Ähnlichkeit

Zum einen können die Konzepte von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG zu ganz unterschiedlichen Beurteilungen des Gefährdungspotentials von Stoffgemischen führen. Zum anderen wird die Einschätzung, welches der Konzepte die angemessenere Vorhersage liefert, daran geknüpft, ob Mischungskomponenten *ähnlich* oder *unähnlich* wirken. Damit wird es zur entscheidenden Frage, was unter *ähnlicher* oder *unähnlicher* Wirkung zu verstehen ist und nach welchen Kriterien Stoffgemische entsprechend klassifiziert werden können.

Was ist ähnliche Wirkung ?

Ökotoxikologische Testverfahren sind in der Regel einfache *Black-Box*-Systeme. Die Änderung eines integralen Effektparameters (z.B. Vermehrung) wird in Abhängigkeit von der Konzentration eines Stoffes im Milieu beschrieben. Dazwischen liegen vielfach unbekannte Interaktionsketten, die üblicherweise in eine toxikokinetische Phase (Aufnahme, Verteilung, Biotransformation, Elimination) und eine toxikodynamische Phase unterteilt werden. Letztere kann in eine primäre Interaktion mit Biomolekülen (*Wirkungsmechanismus*), eine sekundäre Kaskade von funktionellen und strukturellen Störungen (*Wirkungsweise*) und den letztendlich auf organismischer Ebene beobachteten *Effekt* gegliedert werden.

Vor diesem Hintergrund wird der Begriff *ähnliche Wirkung* in der Literatur zu Kombinationswirkungen ebenso unterschiedlich gebraucht wie der Begriff *Wirkung* selbst. Im umfassendsten Sinne bezieht er sich auf die Gesamtheit der Interaktion von Fremdstoff und Biosystem, in spezifischerer Verwendung auf bestimmte Ebenen dieses Interaktions-Prozesses (z.B. Rezeptorbindung) oder auf das biologische Resultat des Wechselwirkungs-Prozesses (z.B. den Tod des Organismus). Viele Autoren arbeiten allerdings nur mit vagen oder gar nicht explizit angegebenen Definitionen, so daß nur aus dem Kontext auf das jeweilige Verständnis des Ähnlichkeitsbegriffes geschlossen werden kann. Diese Begriffsunsicherheit verwundert nicht, wenn man bedenkt, daß es sich bei *ähnlicher Wirkung* um eine Begriffsprägung aus der älteren biometrischen Kombinationswirkungs-

Literatur handelt (Bliss 1939, Plackett und Hewlett 1952), der erst später versucht wurde, eine präzise pharmakologische Bedeutung zuzuschreiben (s. Pöch 1993).

Bedeutung und Konsequenzen unterschiedlicher Verständnisse *ähnlicher* Wirkung lassen sich am einfachsten an Extrempositionen verdeutlichen, die einerseits als *mechanistischer*, andererseits als *phänomenologischer* Ähnlichkeitsbegriff umrissen werden können. Der engste, mechanistische Ähnlichkeitsbegriff, wie er insbesondere von Pöch (1993) vertreten wird, geht davon aus, daß *konzentrations-additives* Verhalten von Stoffen ausschließlich dann eine begründete Annahme darstellt, wenn die Substanzen primär, spezifisch, reversibel und kompetitiv mit einer identischen molekularen Akzeptorstruktur interagieren. Ein sehr weites, phänomenologisches Verständnis von Wirkungs-Ähnlichkeit setzt demgegenüber auf der Ebene der in Betracht stehenden Effekte an, wie sie in die Konzentrations-Wirkungsanalyse eingehen. KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT ist demnach eine plausible Annahme, wenn Substanzen zu einem gemeinsamen toxikologischen Endpunkt führen, unabhängig vom jeweiligen molekularen Wirkungsmechanismus. Diese beiden Extrempositionen führen, insbesondere bei integralen Toxizitätsparametern, zu völlig gegensätzlichen Konsequenzen. Nach enger, mechanistischer Sichtweise ist *ähnliche* Wirkung im Sinne des Konzeptes der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT der Ausnahmefall, nach phänomenologischer Sichtweise hingegen die Regel.

Gewässertoxikologische Arbeiten zur Problematik von Kombinationswirkungen argumentieren meist mit Ähnlichkeitsbegriffen, die zwischen diesen Extrempositionen liegen. Zuweilen ist zwar auch von *gleichen Wirkungsmechanismen* (s. z.B. Veith und Broderius 1987) oder von *gleichen primären Wirkorten* (s. Könemann 1980, Calamari und Vighi 1992) die Rede, implizit werden diese jedoch nicht nur im engen rezeptor-theoretischen Sinne verstanden. Meist wird sogar nur von einer nicht näher präzisierten *ähnlichen Wirkungsweise* gesprochen (s. z.B. Hermens et al. 1984a, Van Leeuwen 1991). Die Unschärfe der Begrifflichkeit spiegelt die Ungenauigkeit und Lückenhaftigkeit des Wissens um Wirkungsmechanismen gewässerrelevanter Chemikalien und die Unsicherheiten ihrer Klassifizierung.

Ähnlichkeit und Spezifität

Diese Ungewißheiten erwachsen nicht zuletzt daraus, daß sich die vorhandenen Erkenntnisse über Fremdstoffwirkungen oftmals nur schwerlich in das simple Schema einer spezifischen Interaktion mit identischen oder unterschiedlichen Akzeptoren einpressen lassen. Ursachen und Tragweite unterschiedlicher Auffassungen *ähnlicher* Wirkung lassen sich deshalb besonders klar am Beispiel sog. *narkotisch* wirkender Substanzen aufzeigen. Gemeint sind lipophile, nicht-ionische und nicht-reaktive Chemikalien, deren Toxizität allein auf ihr Anreicherungsverhalten in Biomembranen (s. z.B. Lipnick 1989, Van Wezel et al. 1996) oder auf ihre nicht-selektive Wechselwirkung mit hydrophoben Domänen von Membranproteinen (s. Pöch 1993, S. 22 f, Franks und Lieb 1987) zurückgeführt wird. Sie bilden eine der zahlen- und mengenmäßig bedeutendsten Gruppen von Umweltchemikalien in Gewässern.

Die strukturell heterogenen Substanzen dieser Klasse¹ erfüllen nicht das toxikodynamische Kriterium einer kompetitiven Interaktion mit einer einzigartigen Bindungsstelle (Pöch 1993, S. 23 f). Dennoch ist es in der aquatischen Toxikologie gängig, von *Narcosis* als einem einheitlichen Wirkungsmechanismus oder einer einheitlichen Wirkungsweise zu sprechen (s. z.B. Lipnick 1989, Schultz et al. 1990, Verhaar, Van Leeuwen und Hermens 1992). Die Wirkungs-Ähnlichkeit liegt in der Nicht-Spezifität (Calamari und Vighi 1992), genauer gesagt in ihrem toxikokinetisch ähnlichen Verteilungsmuster in Bio-Kompartimenten und der Korrelation zwischen Lipophilizität und Toxizität, die durch einfache QSAR²-Modelle beschreibbar ist (sog. *Basislinien-Toxizität*).

Eine ganze Reihe von Autoren hält nun die Annahme *konzentrations-additiven* Zusammenwirkens sämtlicher Stoffe dieser Gruppe für hinreichend gerechtfertigt (Könemann 1981, De Wolf et al. 1988, Verhaar, Van Leeuwen und Hermens 1992 u.a.). In einem Memorandum zur Festsetzung und ökotoxikologischen Begründung von Wasserqualitätszielen in den Niederlanden fand diese Einschätzung entsprechende Berücksichtigung (Stortelder, Van der Gaag und Van der Kooij 1989, Van der Gaag et al. 1991). Calamari und Vighi (1992) halten dies jedoch für eine überzogene Generalisierung. Die Struktur-Ähnlichkeit von Substanzen sei als zusätzliches Indiz *ähnlicher* Wirkung zu berücksichtigen. Bei der Festsetzung von Wasserqualitätszielen sei die Annahme von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT folglich nur innerhalb kleiner, strikt congenerer Teilgruppen von narkotisch wirkenden Substanzen gerechtfertigt. Pöch (1993) schließlich argumentiert, daß aus mechanistischer Sichtweise ein *konzentrations-additives* Verhalten unspezifischer Agenzien überhaupt nicht zu erwarten sei. Der Anschein *konzentrations-additiven* Verhaltens könne auf "bloßer Koinzidenz" beruhen.

Größer kann die Spannbreite unterschiedlicher Auffassungen kaum sein. Der Konsens über *konzentrations-additives* Verhalten *ähnlich* wirkender Stoffe scheint zwar Möglichkeiten präventiven Handelns im Umweltschutz zu eröffnen. Der tiefgreifende Dissens über das richtige Verständnis *ähnlicher Wirkung* blockiert diese jedoch weitgehend wieder.

Was ist unähnliche Wirkung?

Unähnliche Wirkung wurde 1952 von Plackett und Hewlett als Bezeichnung für einen Typus von Kombinationswirkungen eingeführt. Komplementär zu *ähnlicher Wirkung* sollte damit der hypothetische Fall bezeichnet werden, daß Gifte die Reaktion oder den Ausfall "unterschiedlicher und abgegrenzter physiologischer Systeme" bewirken. Nicht anders als beim Typus *ähnlicher Wirkung*, wird die konkrete biologische Bedeutung *unähnlicher Wirkung* seither unterschiedlich interpretiert. Folgt man der Argumentation von Pöch (1993), so ist jede Abweichung vom Modellfall einer spezifischen reversiblen und kompetitiven Wechselwirkung mit einer identischen Rezeptorpopulation als hinreichende Bedingung *unähnlicher Wirkung* zu werten. Überlegungen anderer Autoren legen hingegen nahe, daß *unähnliche Wirkung* nur dann eine angemessene Vorstellung ist, wenn Stoffe unterschiedliche und spezifische primäre Wirkorte haben und sich sonst in keiner Weise wechselseitig beeinflussen (vergl. Könemann 1980). Für Stoffe mit unspezifischer Wirkung

¹ Alkohole, Ester, Ketone, Kohlenwasserstoffe, chlorierte Kohlenwasserstoffe u.a.

² Quantitative Structure Activity Relationships

oder gemeinsamen sekundären Wirkungen wäre demnach die Begrifflichkeit *unähnlicher Wirkung* nicht zur Beschreibung der Realität geeignet, zumindest wenn es um integrale Toxizitätsparameter geht (vergl. Könemann 1981, Hermens und Leeuwangh 1982).

Wie eng oder weit man die Begriffe auch faßt, nach Stand des Wissens konsensfähige Definitionen werden doch immer dazu führen, daß für einen Großteil der Umweltchemikalien keine *ähnliche* Wirkung angenommen werden kann. Im Unterschied zum Fall *ähnlicher Wirkung* ist jedoch strittig, ob valide Prognosen der Toxizität von Gemischen *unähnlicher Wirkung* möglich sind und welches Konzept dafür geeignet ist (s. 3.2).

Indikatoren der Wirkungs-Ähnlichkeit

Die Klassifizierung von Chemikalien in Gruppen *ähnlicher* oder *unähnlicher* Wirkung setzt die entsprechenden Kenntnisse über Wirkungsmechanismen und Wirkungsweisen voraus. Für die meisten gewässerrelevanten Umweltchemikalien ist dieses Wissen jedoch gering oder gar nicht vorhanden. Es liegt daher nahe, ähnlich wie in anderen Bereichen der Chemikalienbewertung auch, qualitative (SAR) oder quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR) als Klassifizierungs-Hilfsmittel zu nutzen: Molekulare Strukturparameter dienen als Indikatoren der *Wirkungs-Ähnlichkeit* (s. Könemann 1980, Calamari und Vighi 1992). Wie schon am Beispiel narkotisch wirkender Substanzen gezeigt, entgeht diese Vorgehensweise allerdings nicht dem Problem unterschiedlicher Verständnisse *ähnlicher* und *unähnlicher* Wirkung. Die Korrelation eines integralen Effektparameters mit physiko-chemischen oder topologischen Deskriptoren ist zwar ein Indiz, aber noch kein Beweis für einen identischen molekularen Wirkungsmechanismus. Weitergehende Limitierungen des QSAR-Ansatzes demonstrieren Calamari und Vighi (1991) am Beispiel einer Gruppe von Phosphorsäureestern. Trotz identischem Wirkungsmechanismus (Acetylcholinesterase-Inhibition) kann der neurotoxische Effekt aufgrund von Unterschieden in der Pharmakokinetik nicht durch eine einheitliche einfache QSAR beschrieben werden.

Calamari und Vighi kommen folglich zu dem Schluß, daß noch ein erheblicher Forschungsbedarf bei der Optimierung von (Q)SAR-basierten Klassifizierungskriterien für *ähnlich* wirkende Stoffe bestehe. Aus regulatorischer Sicht ist diese Konsequenz zwingend, solange daran festgehalten werden muß, daß KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT nur für *ähnlich* wirkende Stoffe ein geeignetes Vorhersage-Konzept ist. Sollte sich allerdings der Verdacht erhärten lassen, daß KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT im allgemeinen auch für integrale Effekte multipler Gemische *unähnlich* wirkender Stoffe einen guten Prognosewert besitzt (vergl. Könemann 1980, Hermens und Leeuwangh 1982, Hermens, Leeuwangh und Musch 1984), so müßte dem Klassifikationsproblem kein zentraler Stellenwert beigemessen werden. Die Ergebnisse dieses Projektes sollten den Forschungsbedarf in diesem Punkt klären.

Fazit

Als kleinster gemeinsamer Nenner des Diskussionsstandes ergibt sich, daß Einvernehmen über *Wirkungs-Ähnlichkeit* oder *-Unähnlichkeit* von Mischungskomponenten nur herstellbar ist, soweit es sich um Substanzen mit spezifischen, molekular definierten Wirkungsmechanismen handelt. Ziel dieses Projektes war es deshalb, entsprechende multi-

ple Gemische exemplarisch zu realisieren und experimentell zu prüfen. Damit sollten Referenzfälle *strikt ähnlicher* und *strikt unähnlicher* Wirkung geschaffen werden. Ein dafür ausreichendes Wissen um Wirkungsmechanismen ist in der Regel nur bei solchen Substanzen gegeben, die als Pestizide oder Pharmaka eingesetzt, oder als "Tools" der physiologischen Forschung verwendet werden. Zu beachten ist, daß spezifische Wirkungen nur in Zusammenhang mit dem jeweiligen Biosystem definierbar sind. Beispielsweise ist die Klassifizierung von s-Triazinen als Photosystem-II-Inhibitoren in einem Test mit Daphnien irrelevant. Testgemische *ähnlicher* und *unähnlicher* Wirkung waren folglich für unterschiedliche Testsysteme auch unterschiedlich zu konzipieren.

3.5 Erkenntnisstand

Schlußfolgerungen aus experimentellen Ergebnissen bis 1991

Eine Arbeitsgruppe zu Wasserqualitätszielen für Europäische Süßwasserfische der "European Inland Fisheries Advisory Commission" (EIFAC) der FAO¹ hat 1980 erstmals eine Literaturrecherche zum Thema "*Combined effects on freshwater fish and other aquatic life of mixtures of toxicants in water*" vorgenommen (EIFAC 1980). 188 Publikationen wurden in dieser Studie ausgewertet. 1986 wurde eine ergänzte und überarbeitete Fassung des Reports vorgelegt (EIFAC 1987, Alabaster et al. 1988), die 19 weitere Untersuchungen berücksichtigte. 1991 wurden die Ergebnisse der EIFAC-Arbeiten in einem Gutachten für das "Scientific Advisory Committee on Toxicology and Ecotoxicology" der Europäischen Gemeinschaften nochmals zusammengefaßt und ergänzt (Calamari und Vighi 1991, 1992).

In den EIFAC-Berichten wurde erstmals der Versuch einer systematischen Sichtung experimenteller Befunde zu Kombinationseffekten im Hinblick auf die Übereinstimmung oder Abweichung von theoretischen Erwartungswerten unternommen. Das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG wurde dabei allerdings a priori ausgeklammert und nur die Hypothese der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT geprüft. Calamari und Vighi (1991, 1992) zogen aus den Ergebnissen den Schluß, daß KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT eine valide Annahme für das Zusammenwirken von Substanzen mit *ähnlicher Wirkungsweise* darstelle. Dieser Minimalkonsens gilt seither in der aquatischen Toxikologie als auch experimentell hinreichend begründet.

Den wichtigsten weiteren Forschungsbedarf sahen Calamari und Vighi (1991, 1992) in der Optimierung von Klassifizierungskriterien für *ähnlich* wirkende Stoffe mit Hilfe des QSAR-Instrumentariums. Die angesichts der tatsächlichen Belastungssituation aquatischer Systeme essentielle Frage nach realistischen Erwartungswerten für die Mischungstoxizität struktur- und wirkungsdifferenter Substanzen klammerten sie hingegen völlig aus. Zur gleichen Zeit resümierte Van Leeuwen (1991) aus Sicht des Risiko-Managements die vorliegenden experimentellen Evidenzen jedoch bereits dahingehend, daß KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT zwar strikt nur für *ähnlich* wirkende Chemikalien gelte, daß sich Sub-

¹ Food and Agriculture Organization of the United Nations

stanzen mit unterschiedlicher Wirkungsweise aber nahezu *konzentrations-additiv* verhielten.

Systematische Prüfung binärer Kombinationen ähnlicher und unähnlicher Wirkung

Eine vergleichende Analyse des Vorhersagewertes beider Konzepte - KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG - für die Effekte einer großen Zahl unterschiedlicher Kombinationen aus jeweils zwei Schadstoffen ist für den Bereich der aquatischen Toxikologie erstmals in den Jahren 1990-1994 im Auftrag des Umweltbundesamtes an der Universität Bremen durchgeführt worden (Grimme et al. 1994, 1996a). Geprüft wurde die Vorhersagbarkeit der Algentoxizität von 124 verschiedenen binären Gemischen aus 13 Pestiziden und 5 Tensiden. Die Analysen wurden auf den Bereich deutlich wirksamer Konzentrationen zwischen EC_{20} und EC_{80} beschränkt. Die Testsubstanzen waren so gewählt, daß sie einerseits gewässertoxikologisch relevante Stoffgruppen und andererseits unterschiedliche Struktur- und Wirkungstypen repräsentierten. Nur bei acht der 124 Testgemische wiesen die Komponenten jeweils identische Wirkungsmechanismen auf.

Obwohl also die Mehrzahl der Gemische die konzeptionellen Prämissen der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG erfüllten, lieferte KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT in gut zwei Drittel aller Fälle Prognosen, die sogar näher am tatsächlichen Beobachtungswert lagen. Mit diesem Konzept ließen sich die EC_{50} -Werte der Mischungen in 80 % aller Fälle mit dem maximalen Fehler einer 1.6-fachen Über- oder Unterschätzung vorhersagen. Das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG resultierte im Vergleich in häufigeren und etwas größeren Fehleinschätzungen. Maximal wurden Abweichungen um den Faktor 3.4 bei Annahme von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und um den Faktor 5.1 bei der Annahme UNABHÄNGIGER WIRKUNG festgestellt. Während Vorhersagen auf Basis der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT zu einer homogenen Verteilung von Über- und Unterschätzungen führten, tendierten Prognosen unter der Hypothese UNABHÄNGIGER WIRKUNG zu einer systematischen Unterschätzung der Mischungstoxizität.

Insgesamt haben die Ergebnisse gezeigt, daß prospektive Abschätzungen der aquatischen Toxizität von Stoffkombinationen auch bei *unähnlich* wirkenden Stoffen in der Regel möglich sind und daß die Kenntnis von Wirkungsmechanismen dazu keine unabdingbare Voraussetzung darstellt. Die dabei in Kauf zu nehmenden Vorhersage- Ungenauigkeiten sind angesichts der Varianz üblicher toxikologischer Testverfahren vergleichsweise gering. Offen blieb, inwieweit diese Resultate auch für multiple Gemische und niedrige Konzentrationen von Einzelsubstanzen unterhalb individueller NOEC-Werte Gültigkeit haben.

Multiple Gemische ähnlich unspezifischer Wirkung

KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT liefert eine gute Prognose der EC_{50} multipler Gemische aus congeneren Substanzen mit *ähnlich unspezifischer* Wirkungsweise. Dies wurde erstmals 1980 von Könemann in Fisch-Toxizitätstests mit 11 Chlorphenolen experimentell gezeigt. Parameter war die Mortalität von Guppies (*Poecilia reticulata*) bei 7- oder 14-tägiger Exposition. Die Mischungskomponenten lagen in jeweils gleichen Fraktionen der LC_{50} -

Werte¹ der Einzelsubstanzen vor (kurz als "äquitoxisches Gemisch" bezeichnet). Gleichlautende Resultate konnten später im gleichen Test mit Gemischen aus 6 Alkylanilinen und 11 Chloranilinen erzielt werden (Hermens, Leeuwangh und Musch 1984). Auch die akute Toxizität (96 h, LC₅₀) eines Gemisches aus 5 Alkyl-Alkoholen gegenüber einer anderen Fischart (*Pimephales promelas*) stimmte mit der Vorhersage nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT sehr gut überein (Broderius und Kahl 1985). Die Fisch-Toxizität (14 d, LC₅₀ *Poecilia r.*) eines Gemisches aus 11 Chlorbenzolen wurde durch KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT allerdings überschätzt (Könemann 1981). Als mögliche Ursache diskutierte der Autor, daß Chlorbenzole "unterschiedliche primäre, aber gemeinsame sekundäre Wirkorte" haben könnten.

Nicht nur für congenere, sondern auch für struktur-unähnliche Reihen organischer Schadstoffe konnte gezeigt werden, daß KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT eine gute Prognose der EC₅₀ von Gemischen liefert, und zwar dann, wenn sich die Toxizität der Mischungskomponenten durch eine einheitliche, lipophilizitäts-abhängige QSAR beschreiben läßt und eine *ähnlich unspezifische*, narkotische Wirkungsweise angenommen werden kann. Experimentelle Evidenz dafür fand wiederum zuerst Könemann (1980) am Beispiel der Fisch-Toxizität (7 oder 14 d, LC₅₀ *Poecilia r.*) einer Kombination aus 50 nicht-reaktiven organischen Verbindungen². Das gleiche Gemisch wurde später auch in Tests mit Wasserflöhen (*Daphnia magna*) geprüft (Hermens et al. 1984a). Für die Toxizitätsparameter Immobilisierung (48 h, IC₅₀) und Mortalität (16 d, LC₅₀) konnte der hohe Prognosewert des Konzeptes der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT bestätigt werden. Sowohl im Fischtest (Könemann 1981) als auch im Daphnientest (Hermens et al. 1984a) wurden die Ergebnisse durch Prüfung von Teilmengen (5 bis 25 Komponenten) des 50-Stoffe-Gemisches erhärtet. Qualitativ gleichwertige Resultate fanden Broderius und Kahl (1985) im akuten Fisch-Toxizitätstest (96 h, LC₅₀) mit *Pimephales*. Ihre Testgemische enthielten 2 bis 21 Komponenten. Sie wurden aus einer Liste von 27 narkotisch wirkenden Stoffen zusammengesetzt, die 7 verschiedene Strukturklassen³ repräsentierten.

Weniger einheitlich waren die Befunde, wenn im Daphnientest nicht letale Effekte, sondern Reproduktionshemmung (16 d, EC₅₀) als Toxizitätskriterium verwendet wurde. Für das von Könemann (1980) konzipierte 50-Stoffe-Gemisch fanden Hermens et al. (1984a) eine geringere Toxizität, als nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT prognostiziert, während die Toxizitätsdaten anders zusammengesetzter Gemische aus 10 oder 25 Narkotika den Vorhersagewerten entsprachen (De Wolf et al. 1988). Eine geringere als nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT kalkulierte Mischungstoxizität wurde auch im Biolumineszenz-Hemmtest mit *Photobacterium phosphoreum* ("Microtox-Test") beobachtet (Hermens et al. 1985a). Das Testgemisch bestand aus 22 nicht-reaktiven organischen Chemikalien. Bestimmt wurde die EC₅₀ nach 15 Min. Inkubationszeit. Die genannten Abweichungen wurden von den Autoren jeweils als gering bewertet, so daß der Prognosewert der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT für *ähnlich unspezifische*, narkotisch wirkende Stoffe ihres Erachtens nicht in Frage gestellt wird.

¹ LC = lethal concentration

² Chlortoluole, Chlorbenzole, aliphatische Chlorkohlenwasserstoffe, Alkohole, Glycolderivate u. a.

³ Alkohole, Ketone, Äther, Alkyl-Halide, Benzol-Derivate, Nitrile, tertiäre aromatische Amine

Mit den referierten Untersuchungen wurde zweifellos Pionierarbeit zur Frage der Prognostizierbarkeit der aquatischen Toxizität multipler Gemische einer gewässertoxikologisch wichtigen Stoffklasse geleistet. Für die Zielsetzungen dieses Projektes ist es allerdings wichtig, einen Referenzfall *konzentrations-additiver* Wirkung eines multiplen Gemisches zur Verfügung zu haben. Ein solcher Referenzfall ist mit den vorgestellten Arbeiten aber noch nicht hinreichend realisiert worden. Dieser müßte idealerweise nämlich folgenden Anforderungen genügen:

- identischer primärer und spezifischer Wirkungsmechanismus der Mischungskomponenten,
- Übereinstimmung von beobachteter und nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT prognostizierter Mischungstoxizität über den gesamten Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve (nicht nur am EC_{50}) sowie
- klare Diskriminierbarkeit der beobachteten Mischungstoxizität von den Vorhersagewerten nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG.

Wie bereits erörtert, gelten die molekularen Grundlagen sog. narkotischer Effekte bisher jedoch noch als unzureichend verstanden, so daß strittig ist, ob die Prämissen der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT auch bei engem mechanistischen Verständnis von *Wirkungs-Ähnlichkeit* erfüllt sind. Wie Hermens, Leeuwangh und Musch (1984) selbst kritisch diskutieren, ist auch die phänomenologische Übereinstimmung von beobachteter Toxizität und Prognosewerten nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT kein hinreichendes Argument für das tatsächliche Vorliegen *ähnlicher Wirkung*, da sie auch in Fällen eindeutig struktur- und wirkungs-differenter Substanzen auftreten kann. Weiterhin kann, wegen der in Abschnitt 3.2 dargelegten Interdependenzen, aus der Übereinstimmung mit Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT allein noch nicht geschlossen werden, daß UNABHÄNGIGE WIRKUNG unzutreffende Prognosen liefert. Der alternative Vergleich mit Vorhersagewerten nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG erfordert allerdings die Bestimmung des Effektes jeder einzelnen Mischungskomponente. Im Falle des zitierten Gemisches aus 50 Stoffen in sog. "*äquitoxischen*" Konzentrationen bedeutet dies beispielsweise die statistisch valide Schätzung der Effekte von Einzelstoff-Konzentrationen, die lediglich 1/50 der jeweiligen EC_{50} betragen. Darauf waren Design und Datenumfang der vorliegenden Studien nicht angelegt. Selbst die der Kalkulation von Erwartungswerten für die Mischungstoxizität zugrunde gelegten EC_{50} -Werte von Einzelsubstanzen wurden nicht immer experimentell bestimmt, sondern sind teilweise mit Hilfe von QSAR-Gleichungen nur geschätzt worden (s. Hermens et al. 1984a, De Wolf et al. 1988). Wenngleich dieses Projekt auf die Problematik von Gemischen *unähnlicher* Wirkung zielte, mußte die experimentelle Realisierung von Referenzgemischen *ähnlicher spezifischer* Wirkung in den zu verwendenden Testsystemen deshalb ein wichtiges Teilziel sein.

Multiple Gemische unähnlicher Wirkung

In einer Reihe von Arbeiten wurde an der Universität Utrecht bereits in den 80iger Jahren der Frage nachgegangen, inwieweit KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT auch für die EC_{50} -Werte multipler Gemische aus *unähnlich* wirkenden Stoffen eine brauchbare Prognose liefert. Insgesamt betrachtet ergibt sich, daß die beobachtete Mischungstoxizität tendenziell geringer ausfällt, als nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT erwartbar wäre. Je nach

Anzahl und Art der Mischungskomponenten sowie des verwendeten Toxizitätsparameters fällt die Überschätzung mehr oder weniger deutlich aus.

So wurde der letale Effekt einer Kombination aus vier heterogenen Komponenten¹ im Fischtest (14 d, LC₅₀ *Poecilia r.*) als "klare Abweichung von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT" bewertet (Könemann 1981), während bei umfangreicheren Gemischen mit 8 oder 24 Komponenten "nahezu KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT" festgestellt wurde (Hermens und Leeuwangh 1982). Im gleichen Test wurde auch ein 33-Stoffe-Gemisch geprüft, daß aus drei unterschiedlichen Teilgruppen² mit je 11 Komponenten zusammengesetzt war. Auf Grund von QSAR-Analysen wurde davon ausgegangen, daß die Gruppen unterschiedliche Wirkungsweisen repräsentierten, die Substanzen innerhalb dieser Gruppen aber *ähnlich* wirken. Im Ergebnis wurde eine "fast vollständige KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT" festgestellt (Hermens, Leeuwangh und Musch 1985). Im Daphnientest wurden letale und subletale Effekte eines heterogenen 14-Stoffe-Gemisches verglichen (Hermens et al. 1984b). Während die Mortalitätsprüfung (48 h, LC₅₀) "nahezu KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT" ergab, fiel die Reproduktionshemmung (16 d, EC₅₀) deutlich schwächer aus als der entsprechende Erwartungswert. Ergänzende Untersuchungen mit einem 9-Stoffe-Teil-Gemisch und einem noch empfindlicheren Reproduktionsparameter (16 d, EC₁₀ Längenwachstum) erhärteten den Befund nicht-konzentrations-additiver subletaler Mischungstoxizität (Deneer, Seinen und Hermens 1988). Weiter verkomplizieren läßt sich das Bild, wenn man die Bedeutung des Entwicklungszustandes von Organismen und der Umweltbedingungen in Betracht zieht, wie Hamilton und Buhl (1990) dies für ein Gemisch aus 13 verschiedenen anorganischen Umweltchemikalien getan haben. Während sich die Toxizität (96 h, LC₅₀) gegenüber 9-13 Wochen alten Lachsen (*Oncorhynchus tshawytscha*) in Süßwasser als *konzentrations-additiv* erwies, ergab sich im Test mit 18-21 Wochen alten Tieren in Brackwasser eine deutlich weniger als *konzentrations-additive* Mischungstoxizität.

Die in den zitierten Arbeiten verwendeten Mischungskomponenten wurden vor allem mit ihrer Umweltrelevanz begründet. Kenntnisse über Wirkungsmechanismen und Wirkungsweisen dieser Substanzen sind teils sehr genau, teils aber auch nur gering oder gar nicht vorhanden. Sowohl Substanzen mit sehr spezifischen primären Wirkungsmechanismen als auch sog. *multi-site*-Inhibitoren und unspezifisch wirkende Stoffe sind vertreten. Einer Debatte über die Frage der *Ähnlichkeit* oder *Unähnlichkeit* der Effekte, die beim jeweiligen Testorganismus und Toxizitätsparameter zum Tragen kommen, wird damit ein breiter Raum eröffnet. Dies erschwert die Möglichkeit der Ableitung verallgemeinerbarer Aussagen zur Prognostizierbarkeit der Toxizität von Mischungen *unähnlich* wirkender Stoffe. In diesem Projekt wurde deshalb versucht, Referenzfälle einer *strikt unähnlichen* Wirkung zu realisieren. Damit ist gemeint, daß Mischungskomponenten nach Stand des verfügbaren Wissens und unter Anlegung strengst möglicher Kriterien im jeweiligen Testorganismus unterschiedliche und eindeutig abgrenzbare Wirkungsmechanismen aufweisen. Dem toxikologischen Kriterium der *Wirkungs-Unähnlichkeit* mußte dazu Vorrang vor der Umweltrelevanz der Testsubstanzen eingeräumt werden.

¹ K⁺, Cu²⁺, Decamethrin (Pyrethroid), Triphenylzinnchlorid

² nicht-reaktive chlorierte Kohlenwasserstoffe, Chloraniline, Chlorphenole

Die in der Literatur dokumentierten experimentellen Befunde lassen die Hypothese stützen, daß KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT für regulatorische Zwecke eine "reasonable worst case estimation" (s. 3.2) der Mischungstoxizität unähnlich wirkender Stoffe darstellt. Angesichts der beobachteten Überschätzungen stellt sich aber die Frage, ob das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG nicht eine angemessenere und genauere Prognose liefern könnte. In der Reihe zitierter Arbeiten ist nur einmal von Hermens und Leeuwangh (1982) der Versuch unternommen worden, dieser Frage nachzugehen. Die von ihnen unter bestimmten Annahmen über die Steigung der Konzentrations-Wirkungskurven vorgelegten Berechnungsergebnisse weisen aus, daß die beobachtete Fisch-Toxizität von 8- und 24-Stoff-Gemischen zwischen den Vorhersagewerten nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG¹ und KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT lag. Wie bereits gesagt, hängt die Sicherheit eines Vergleichs mit UNABHÄNGIGER WIRKUNG bei multiplen Gemischen allerdings entscheidend an der validen Bestimmung der Konzentrations-Wirkungskurven von Einzelstoffen im Bereich niedriger Effekte ab. Dafür eine tragfähige experimentelle und statistische Vorgehensweise zu entwickeln, war Aufgabe dieses Projektes.

Mischungstoxizität bei niedrigen Einzelstoff-Konzentrationen

Alle bisher zitierten Untersuchungen haben mit sog. "äqui-toxischen" Gemischen experimentiert. Im Falle des umfangreichsten bisher geprüften Gemisches *ähnlich unspezifischer* Wirkung bedeutet das, daß 50 Mischungskomponenten jeweils in Konzentrationen von 1/50 der Einzelstoff-EC₅₀-Werte vorlagen (Könemann 1980, Hermens et al. 1984a). In Übereinstimmung mit der Hypothese der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT betrug der letale Gesamteffekt dieses Gemisches in Fisch- und Daphnientest annähernd 50 %. Einzelstoffe in Konzentrationen von nur 0.02 x EC₅₀ können also zur Gesamt-Toxizität eines Gemisches *ähnlich unspezifisch* wirkender Narkotika beitragen.

Mit gleichen Mischungskomponenten, aber verändertem Versuchsdesign wurde diesem Phänomen weiter nachgegangen. Dazu wurde im Daphnientest die EC₅₀-Konzentration eines Stoffes in Gegenwart und in Abwesenheit fixer, sehr niedriger Konzentrationen der anderen 49 Stoffe bestimmt (Deneer et al. 1988). Die Ergebnisse lieferten Evidenzen dafür, daß Einzelstoffe mit narkotischer Wirkungsweise selbst in Konzentrationen von nur 0.0025 ihrer IC₅₀ noch zur Gesamttoxizität beitragen und diese durch KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT korrekt vorhergesagt wird. Van Leeuwen (1991) resümierte, daß diese Konzentrationen an oder unterhalb der NOEC von Einzelstoffen lägen. Diese Argumentation unterstellt, daß bestimmte Erfahrungswerte über die Steilheit von Konzentrations-Wirkungskurven und das Verhältnis von NOEC- zu EC₅₀-Werten auch auf jede Einzelsubstanz des multiplen Gemisches zutreffen. Sie kann daher immer angezweifelt werden, solange die NOEC-Werte nicht allesamt bestimmt werden.

Zusätzlich gestützt wird der Verdacht, daß auch Konzentrationen unterhalb von NOEC-Werten zur Gesamt-Toxizität eines Gemisches beitragen können, durch eine Arbeit, in der *ähnlich unspezifische* Substanzen nicht im Verhältnis der EC₅₀-Werte, sondern im Verhältnis ihrer NOEC-Werte kombiniert wurden (Hermens et al. 1985b). Für 10 Substan-

¹ Die Autoren sprechen von "Independent action, r=0" in Abgrenzung zu anderen theoretischen Sonderfällen UNABHÄNGIGER WIRKUNG; zur Erläuterung s. Plackett & Hewlett 1948, Könemann 1981.

zen lagen experimentelle NOEC-Werte im Wachstumshemmtest mit *Daphnia magna* (16 d) vor. Für weitere 15 wurden sie mit einem QSAR-Modell geschätzt. Experimentell bestimmt wurden die NOEC-Werte für ein Gemisch der ersten 10 sowie ein Gemisch aller 25 Substanzen. Im Rahmen der experimentellen Unsicherheiten kamen die Autoren insgesamt zu dem Schluß, daß die NOEC-Werte dieser Gemische auf Basis der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT vorhersagbar waren.

Der experimentelle Ergebnisstand ist wiederholt als ausreichender Beleg dafür gewertet worden, daß NOEC-Werte von Einzelstoffen für multiple Gemische *ähnlich* wirkender Xenobiotika bedeutungslos seien (Könemann 1980, Hermens, Leeuwangh und Musch 1985, Broderius und Kahl 1985, Deneer et al. 1988). Ob diese Schlußfolgerung nicht nur für Umweltchemikalien mit *ähnlich unspezifischer*, sondern auch für Substanzen mit *ähnlich spezifischem* Wirkungsmechanismus gerechtfertigt ist und ob sie strengen statistischen Maßstäben Stand hält, ist bisher experimentell nicht belegt worden. Die Prüfung dieser Frage war deshalb ein weiteres wichtiges Teilziel dieses Projektes.

Keinen überzeugenden experimentellen Hinweis gibt es bisher dafür, daß auch im Falle von Gemischen *unähnlicher* Wirkungsweise Einzelkomponenten unterhalb individueller NOEC-Konzentrationen zur Gesamt-Toxizität signifikant beitragen könnten. Hermens und Leeuwangh (1982) konnten als Ergebnis ihrer Mortalitätsstudien an Fischen lediglich feststellen, daß Chemikalien mit unterschiedlichen Wirkungsweisen noch in Konzentrationen von etwa 1/10 der LC₅₀ zur Gesamttoxizität beitragen. Wiederholt ist in der Literatur die Hypothese formuliert worden, daß für spezifische rezeptor-vermittelte Wirkungen zwar die Existenz von Schwellenwerten angenommen werden könne, daß jede organische Chemikalie aber allein auf Grund ihrer Hydrophobizität in jeder Konzentration zu einem unspezifischen narkotischen Gesamt-Effekt beitragen könne (Könemann 1980, Hermens und Leeuwangh 1982, Broderius und Kahl 1985, Deneer et al. 1988). Experimentelle Belege dieser These sind allerdings nicht erbracht worden.

Die Konzeption dieses Projektes ist nicht von dieser komplexen Annahme, sondern von den beiden Grenzfällen *strikt unabhängiger* und *strikt konzentrations-additiver* Mischungstoxizität ausgegangen. Mit dem Versuch der experimentellen Wirkungs-Analyse multipler Gemische *unähnlich* wirkender Stoffe in niedrigen Einzelstoff-Konzentrationen wurde dabei Neuland beschritten.

4 Arbeitsziele

Ziel der Arbeiten war es, aus exemplarischen Untersuchungen an ausgewählten Stoffgemischen und Biotest-Systemen Antworten auf die in der Problemstellung formulierten Fragen zu gewinnen (Abschnitt 2). Dazu wurden

- die Schlüsselbegriffe der Projekt-Thematik spezifiziert oder operationalisiert,
- der Untersuchungsrahmen abgesteckt und
- die Arbeit in Teilziele gegliedert.

Schlüsselbegriffe

Folgende Spezifizierungen und Operationalisierungen wurden getroffen:

VORHERSAGBARKEIT: Vorhersagen der Toxizität von Gemischen werden auf der Grundlage experimentell ermittelter und statistisch abgesicherter Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von Einzelsubstanzen unter Verwendung der Konzepte der KONZENTRATION-ADDITIVITÄT und der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG kalkuliert.

BEURTEILUNG: Die Beurteilung erfolgt durch den statistisch gestützten Vergleich zwischen beobachteter und vorhergesagter Mischungstoxizität. Beurteilt wird, ob eine Vorhersage überhaupt möglich ist und wenn, mit welchem Konzept unter welchen Bedingungen und mit welcher Genauigkeit.

AQUATISCHE TOXIZITÄT: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für integrale Toxizitätsparameter wurden in Labortests an Populationen einzelner Spezies bestimmt.

MULTIPLE STOFFGEMISCHE: Testgemische wurden aus 14 bis 18 analysenreinen Komponenten in definierten Mischungsverhältnissen und analytisch validierten Konzentrationen zusammengesetzt. Gemische *unähnlicher* Wirkung und "Referenzgemische" *ähnlicher* Wirkung wurden vergleichend untersucht.

UNÄHNLICHE WIRKUNG: Testgemische *unähnlicher* Wirkung enthielten Substanzen, denen nach Stand des Wissens unterschiedliche *spezifische*, molekular definierte und im jeweiligen Testorganismus relevante Wirkungsmechanismen eindeutig zugeordnet werden können. "Referenzgemische" *ähnlicher* Wirkung sind entsprechend aus Substanzen mit identischem *spezifischen* Wirkungsmechanismus zusammengesetzt worden.

NIEDRIGE KONZENTRATIONEN: Realisiert wurden Situationen, in denen die Einzelkomponenten der Testgemische jeweils in Konzentrationen unterhalb konventionell bestimmter NOEC-Werte vorlagen. Als Leitwert ("Benchmark-Konzentration") diente die EC_{01} .

Untersuchungsrahmen

Im gegebenen Zeit- und Kostenrahmen wurden folgende Festsetzungen getroffen:

- Untersuchung multipler Mischungstoxizitäten an 2 unterschiedlichen Testorganismen, nämlich *Algen* und *Leuchtbakterien*,
- Prüfung je eines Gemisches *ähnlicher* und *unähnlicher* Wirkung in beiden Biotests,
- Prüfung jedes Gemisches in 2 unterschiedlichen Mischungsverhältnissen.

Insgesamt waren also 8 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen multipler Gemische zu untersuchen. Limitierend waren die dazu notwendigen Vorarbeiten, insbesondere die Konzentrations-Wirkungsanalysen der zahlreichen Einzelsubstanzen.

Teilziele

Folgende Teilziele wurden schrittweise realisiert:

- I. Konzeption der Kombinations-Wirkungsanalyse
- II. Anpassung und Weiterentwicklung von biometrischen Verfahren und experimentellen Methoden
- III. Analyse der Mischungstoxizität *ähnlich* wirkender Stoffe („Referenzgemische“)
- IV. Analyse der Mischungstoxizität *unähnlich* wirkender Stoffe

Teilziel I: Konzeption

Aus der Zielsetzung resultieren Anforderungen an die experimentellen und biometrischen Elemente der Kombinations-Wirkungsanalyse. Welches diese Elemente und Anforderungen sind und inwieweit sie sich wechselseitig bedingen, wird in Abschnitt 5 dargelegt.

Teilziel II: Methodenentwicklung

Die Erfüllung der Anforderungen machte Weiterentwicklungen des experimentellen, vor allem aber des biometrischen Instrumentariums erforderlich. Zentrale Punkte waren die Bestimmung niedriger Effekt-Konzentrationen und die Übertragung biometrischer Modelle für binäre Gemische auf multiple Gemische. Abschnitt 6 beschreibt die Methoden.

Teilziel III: Referenzgemische ähnlicher Wirkung

An multiplen Referenzgemischen *ähnlich spezifischer* Wirkung wurden 3 Fragen geprüft:

- Liefert KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT eine valide Prognose der Mischungstoxizität?
- Gilt dies auch, wenn Einzelstoff-Konzentrationen unterhalb von NOEC-Werten liegen?
- Sind Vorhersagen nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG deutlich unzutreffend?

Abschnitt 7 beantwortet diese Fragen.

Teilziel IV: Mischungstoxizität unähnlich wirkender Stoffe

Mit der erfolgreichen Realisierung der ersten 3 Teilziele waren alle Vorbedingungen erfüllt, um die Kernfragen des Projektes experimentell anzugehen:

- Sind die Algen-Toxizität und die Bakterien-Toxizität multipler Gemische von Stoffen mit *unähnlichen spezifischen* Wirkungsmechanismen durch das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT oder das der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG voraussagbar?
- Sind unerwünschte Kombinationseffekte *unähnlich* wirkender Stoffe auch dann begründet zu erwarten, wenn die Einzelstoff-Konzentrationen unterhalb von NOEC-Werten liegen?

Abschnitt 8 dokumentiert die Untersuchungsergebnisse.

5 Konzeption der Kombinations-Wirkungsanalyse

Die Vorgehensweise einer quantitativen Kombinations-Wirkungsanalyse wird in Abb. 5.1 veranschaulicht. Mit der Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von ausgewählten Einzelstoffen wird zunächst eine Ausgangsbasis geschaffen. Die Qualität dieser Basis, daß heißt Art und Anzahl der ausgewählten Stoffe, Art und Umfang des Datenmaterials sowie die Güte der biometrischen Analyse, determiniert bereits weitgehend die Aussagemöglichkeiten der gesamten Studie. Im zweiten Abschnitt der Analyse werden Gemische gebildet, die Einzelstoffe in definierten Verhältnissen enthalten. Die Toxizität dieser Gemische wird einerseits prognostiziert, andererseits tatsächlich experimentell bestimmt. Die Prognose erfolgt durch Verrechnung der Einzelstoff-Daten nach Maßgabe der Vorhersage-Konzepte (KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG). Die experimentelle Bestimmung nutzt das gleiche Instrumentarium der Konzentrations-Wirkungsanalyse wie die Einzelstoff-Untersuchung und bezieht sich auf die gleichen Toxizitätsparameter. Im Ergebnis können die vorhergesagte und die beobachtete Mischungstoxizität in vergleichbaren Maßzahlen ausgedrückt werden, nämlich als Stärke eines definierten Effektes oder als Höhe einer definierten Effekt-Konzentration.

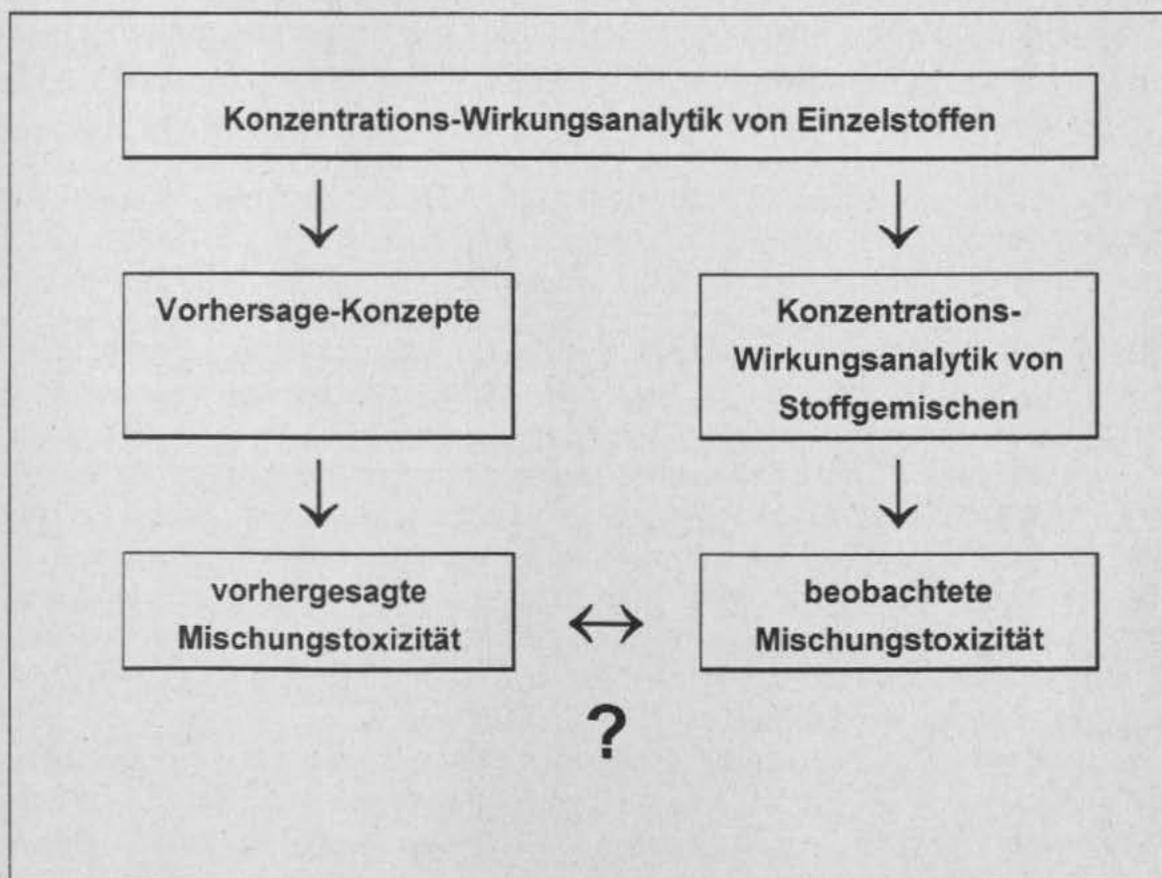


Abb. 5.1: Vorgehensweise bei der quantitativen Analyse von Kombinations-Wirkungen

Im dritten Teil der Analyse werden die Verhältnisse zwischen Vorhersagen und Beobachtungen geprüft: Wie groß sind die Abweichungen, sind sie statistisch signifikant und welches Konzept liefert die genauere Vorhersage? Das gewonnene Datenmaterial bietet zusätzlich die Möglichkeit, in einem vierten, in der Abbildung nicht visualisierten Schritt die Gesamt-Toxizität von Gemischen mit der Toxizität der einzelnen Komponenten zu vergleichen. Ist ein toxischer Gesamt-Effekt des Gemisches auch dann zu beobachten, wenn die Einzelstoffe in Konzentrationen unterhalb von NOEC-Werten vorliegen und ist dieser gegebenenfalls sogar quantitativ vorhersagbar?

Diese Vorgehensweise galt es, zielorientiert zu spezifizieren. Die Spezifikationen betreffen 7 experimentelle und biometrische Elemente der Kombinations-Wirkungsanalyse:

1. die Auswahl und Optimierung geeigneter Biotests,
2. die Zusammensetzung multipler Testgemische,
3. die Auswahl geeigneter Mischungskomponenten,
4. das *Design* der experimentellen Konzentrations-Wirkungsanalyse,
5. die Verfahren der biometrischen Konzentrations-Wirkungsanalyse,
6. die Operationalisierung der NOEC,
7. den Vergleich beobachteter Mischungstoxizitäten mit Vorhersagen.

Tab. 5.1 listet die Anforderungen auf, die an jedes dieser Elemente zu stellen waren. Tab. 5.2 faßt die Merkmale des experimentellen und biometrischen Ansatzes zusammen, mit dem diesen Anforderungen entsprochen wurde. Die nachfolgenden Abschnitte begründen die Anforderungen und erläutern ihre Umsetzung.

5.1 Biotests

Dieses Projekt war darauf ausgerichtet, multiple Mischungstoxizitäten in exemplarisch angelegten Fällen zu untersuchen. Eine solche Konzeption führt am Ende zwangsläufig in die Diskussion darüber, ob den Ergebnissen tatsächlich ein Regelfall-Charakter beigegeben werden kann oder ob Spezialfälle beobachtet wurden, die nur für die untersuchten Toxizitätsparameter, Testbedingungen und Testgemische Gültigkeit haben. Ein starkes Indiz für einen regelhaften Zusammenhang wäre allerdings dann gegeben, wenn der Typus *ähnlicher* oder *unähnlicher* Wirkung, mit unterschiedlichen Mischungskomponenten realisiert und in unterschiedlichen Biotests geprüft, zu jeweils gleichartigen Resultaten führte. Zumindest zwei unterschiedliche Testspezies, die verschiedene Organismenreiche, Trophiestufen und Stoffwechselformen repräsentieren, sollten deshalb vergleichend untersucht werden. In Betracht gezogen wurden dabei nur solche Organismengruppen, die auch in standardisierten aquatischen Toxizitätstests Verwendung finden. Auf diese Weise werden Vergleiche mit vorhandenen Toxizitätsdaten ermöglicht und die Relevanz der Ergebnisse für die regulative Chemikalienbewertung außer Frage gestellt.

Kombinations-Wirkungsanalysen multipler Gemische erfordern die Bestimmung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zahlreicher Einzelstoffe. Gleichzeitig waren hohe Anforderungen an den Umfang der Datensätze und die Qualität des Datenmaterials zu stel-

len. Qualitätsmaßstäbe sind dabei eine möglichst geringe Varianz innerhalb paralleler Versuchsansätze und eine möglichst gute Reproduzierbarkeit in unabhängigen Versuchswiederholungen. Der hohe Stellenwert dieser Anforderungen ergibt sich aus drei Gründen:

- Die Realisierung der Projektziele setzte die statistisch valide Schätzung niedriger Effekt-Konzentrationen voraus. Diese ist ihrerseits abhängig von Qualität und Quantität des Datenmaterials.
- Einzelstoffe und multiple Gemische konnten nicht gleichzeitig in parallelen Ansätzen, sondern nur nacheinander analysiert werden. Der Vergleich beobachteter Mischungstoxizitäten mit Vorhersagen, die auf zuvor aufgenommenen Einzelstoff-Daten beruhen, unterstellt aber deren Reproduzierbarkeit. Andernfalls ist er wertlos.
- Vorhersagen der Mischungstoxizität sind mit den Unsicherheiten der Konzentrations-Wirkungsanalysen der Einzelstoffe befrachtet. Je größer die Varianz und je schlechter die Reproduzierbarkeit, desto größer ist auch die Unschärfe der Vorhersagen. Unterschiede zwischen konkurrierenden Vorhersagen einerseits sowie zwischen Vorhersagen und Beobachtungen andererseits drohen daher zu verschwimmen, wenn das "experimentelle Rauschen" groß ist.

Die Erfolgsaussichten waren also an eine hohe Testkapazität in Verbindung mit geringer Varianz und guter Reproduzierbarkeit geknüpft. Unter den Bedingungen eines engen Zeit- und Kostenrahmens konnte diesen Anforderung nur mit erprobten Biotests an einzeligen Organismen sicher entsprochen werden. Grünalgen, als Vertreter der aquatischen Primärproduzenten, und Leuchtbakterien, als Vertreter der Destruenten, waren deshalb die Testorganismen der Wahl.

Als *integrale* Toxizitätsparameter (s. 3.1) waren die Hemmung der Algen-Vermehrung und die Hemmung der bakteriellen Biolumineszenz zu bestimmen. Expositionsdauer, Testbedingungen und Meßverfahren waren dabei so aufeinander abzustimmen, daß einerseits alle jeweils relevanten Wirkungsmechanismen in diesen Parametern manifest werden, andererseits ein möglichst breites Spektrum von Substanzen mit unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften schnell und reproduzierbar mit hoher Empfindlichkeit testbar ist. Die Problematik dieser widerstreitenden Anforderungen kann mit wenigen Beispielen verdeutlicht werden:

- Die Algen-Toxizität spezifisch wirkender schwacher Säuren, wie z.B. Sulfonylharnstoffen, ist stark pH-abhängig (Fahl et al. 1995). Eine kultivationstechnisch bedingte, im Standard-Algentest zulässige pH-Änderung um 1,5 Einheiten steht daher den Erfordernissen konstanter Testbedingungen als Voraussetzung geringer Varianz und hoher Reproduzierbarkeit entgegen.
- Die Bakterien-Toxizität spezifischer DNA-Synthese-Inhibitoren kann im standardisierten 30-Minuten Biolumineszenz-Hemmtest nicht detektiert werden, da sie erst bei längerer Inkubationszeit, unter reproduktiven Bedingungen zum Tragen kommt (Backhaus et al. 1997). Lange Expositionszeiten stehen andererseits nicht nur den Erfordernissen einer hohen Testkapazität entgegen, sondern können beispielsweise bei flüchtigen oder hydrolyse-instabilen Substanzen dazu führen, daß dem beobachteten Effekt keine eindeutig definierte, während der Testdauer weitgehend konstante Konzentration zugeordnet werden kann.

Tab. 5.1: Spezifische Konzeption der Kombinations-Wirkungsanalyse
I. Elemente und Anforderungen

Elemente	Anforderungen
Biotests	<ul style="list-style-type: none"> • aquatische Testorganismen verschiedener Trophiestufen • hohe Testkapazität • minimierte Varianz und maximierte Reproduzierbarkeit • integrale Toxizitäts-Parameter • Manifestierung relevanter Wirkungsmechanismen während der Expositionsdauer • Testbarkeit eines physiko-chemisch breiten Substanzspektrums
Testgemische	<ul style="list-style-type: none"> • unstrittig <i>ähnliche</i> oder <i>unähnliche</i> Wirkung der Komponenten • deutlicher Gesamteffekt bei nicht signifikant wirksamen Einzelstoff-Konzentrationen konzept-abhängig erwartbar • deutlich unterschiedliche Vorhersagen der Mischungstoxizität nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG • unterschiedliche, jeweils fixe Mischungsverhältnisse
Mischungs-komponenten	<ul style="list-style-type: none"> • spezifischer Wirkungsmechanismus • keine indirekten Effekte • in hoher Reinheit im Handel erhältlich • Analyseverfahren verfügbar • Löslichkeit in wäßrigen Testmedien $\geq EC_{80}$ • Konzentrations-Stabilität unter Testbedingungen • möglichst geringe Varianz der Effekte • möglichst gute Reproduzierbarkeit der Konzentrations-Wirkungskurve • möglichst steile Konzentrations-Wirkungskurve • vorrangig gewässerrelevant
Experimentelle Konzentrations-Wirkungsanalyse	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 11 Test-Konzentrationen zur Abdeckung des Bereichs $\leq EC_{01}$ bis $\geq EC_{80}$ • mindestens 3 Replikate je Konzentrations-Stufe • mindestens 3 x 4 bzw. 3 x 3 Kontrollen (Algen- bzw. Leuchtbakterientest) • flexible Konzentrations-Abstufung in Anpassung an die Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurve • analytisch validierte, während der Testdauer konstante Testkonzentrationen
Biometrische Konzentrations-Wirkungsanalyse	<ul style="list-style-type: none"> • valide parametrische Modellierung asymmetrisch sigmoider Kurvenverläufe • valide Schätzung von Effekt-Konzentrationen und statistischen Unsicherheiten bei effekt-niveau-abhängiger Varianz (Heteroskedasizität)
Operationalisierung der NOEC	<ul style="list-style-type: none"> • valide Schätzung niedriger Effekt-Konzentrationen $\geq EC_{01}$ • "klassische" varianzanalytische Schätzung von NOEC's
Vergleich mit Vorhersagen	<ul style="list-style-type: none"> • Vergleich mit Vorhersagen beider Konzepte: KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT <u>und</u> UNABHÄNGIGE WIRKUNG • "globaler" Vergleich im Intervall von EC_{10} bis $\geq EC_{80}$

Tab. 5.2: Spezifische Konzeption der Kombinations-Wirkungsanalyse
II. Experimenteller und biometrischer Ansatz

Biotests <ul style="list-style-type: none"> Organismus Parameter Expositionsdauer 	Algentest <ul style="list-style-type: none"> <i>Scenedesmus vacuolatus</i> Reproduktions-Hemmung 24 h (1-Generationen-Test an Synchronkulturen) 		Leuchtbakterientest <ul style="list-style-type: none"> <i>Vibrio fischeri</i> Biolumineszenz-Hemmung <table border="1" data-bbox="850 495 1304 555"> <tr> <td data-bbox="850 495 1072 555">• 24 h (Langzeit-Test)</td> <td data-bbox="1080 495 1304 555">• 30 Min. (Kurzzeit-Test)</td> </tr> </table>		• 24 h (Langzeit-Test)	• 30 Min. (Kurzzeit-Test)		
• 24 h (Langzeit-Test)	• 30 Min. (Kurzzeit-Test)							
Testgemische & Mischungs-komponenten <ul style="list-style-type: none"> Anzahl der Stoffe Wirkungs-mechanismus Stoffklasse(n) Mischungs-verhältnis 	Referenzgemisch ähnlicher Wirkung <ul style="list-style-type: none"> 18 PS-II Inhibitoren s-Triazine 		Gemisch unähnlicher Wirkung <ul style="list-style-type: none"> 16 unterschiedliche molekulare Wirkorte Herbizide, Fungizide, Antibiotika 		Gemisch unähnlicher Wirkung <ul style="list-style-type: none"> 14 unterschiedliche molekulare Wirkorte Pestizide, Antibiotika, Chemotherapeutika 		Referenzgemisch ähnlicher Wirkung <ul style="list-style-type: none"> 16 Entkoppler substituierte Phenole 	
	EC ₅₀ -Verhältnis	EC ₀₁ -Verhältnis	EC ₅₀ -Verhältnis	EC ₀₁ -Verhältnis	EC ₅₀ -Verhältnis	EC ₀₁ -Verhältnis	EC ₅₀ -Verhältnis	EC ₀₁ -Verhältnis
Experimentelle Konzentrations-Wirkungsanalyse <ul style="list-style-type: none"> Konz.-Stufen Replikate Kontrollen 	Analyse von Einzelstoffen und Gemischen mindestens im Bereich von EC₀₁ bis EC₈₀							
	<ul style="list-style-type: none"> 12 3 3 x 6 				<ul style="list-style-type: none"> 16 3 3 x 4 			
Biometrische Konzentrations-Wirkungsanalyse <ul style="list-style-type: none"> Schätzalgorithmus Anpassungsgüte Effekt-Konzentrationen & statistische Unsicherheit 	Best Fit Modeling mit 10 verschiedenen parametrischen Regressions-Modellen <ul style="list-style-type: none"> GLS (<i>generalized least square</i>); robuste nicht-parametrische Gewichtsschätzung Beurteilung nach SAE (<i>sum of absolute errors</i>) und Residuenanalyse Bestimmung mit <i>Resampling</i>-Verfahren (<i>bootstrap</i>) 							
Operationalisierung der NOEC <ul style="list-style-type: none"> Benchmark's NOEC's 	Bestimmung niedriger Effektkonzentrationen im Bereich \geq EC₀₁ (Benchmark's) <ul style="list-style-type: none"> Statistische Schätzung mit den o.g. Verfahren des <i>best fit modeling</i> Bestimmung im <i>DUNNETT</i>-Test 							
Vergleich mit Vorhersagen <ul style="list-style-type: none"> Abweichungsmaße Statistische Beurteilung 	Vorhersagen auf der Basis von Konzentrations-Additivität und Unabhängiger Wirkung <ul style="list-style-type: none"> IPQ (<i>Index on Prediction Quality</i>) Konfidenzintervalle der IPQ-Werte als Beurteilungskriterium (Vorhersage-Unschärfe und Signifikanz von Abweichungen) 							

Die Beispiele zeigen, daß mit den normierten Biotests an Algen (DIN/ISO 8692) und Leuchtbakterien (DIN 38412 Teil 34) den projekt-spezifischen Anforderungen nicht hinreichend Rechnung getragen werden konnte. Daraus wurden folgende Konsequenzen gezogen:

- An Stelle des Standard 72-h-Algentests mit *Scenedesmus subspicatus* wurde ein speziell optimierter 24-h-Ein-Generationen-Algentoxizitätstest auf der Basis synchronisierter Flüssigkulturen der einzelligen Grünalge *Scenedesmus vacuolatus*¹ verwendet. Dies bedeutete einerseits eine Erhöhung des kultivations- und meßtechnischen Aufwandes, andererseits aber auch eine deutliche Reduktion der Testdauer. Ausgangspunkt war ein Testverfahren (Faust et al. 1992), das bereits erfolgreich für die Analyse der Algentoxizität binärer Kombinationen von Pestiziden und Tensiden eingesetzt worden ist (Altenburger et al. 1990, Faust et al. 1993, 1994, Grimme et al. 1994, 1996a). Dieses wurde so modifiziert, daß die Testkapazität gesteigert, Varianz und Reproduzierbarkeit weiter vermindert und die Testbarkeit auf flüchtige und schäumende Substanzen ausgedehnt werden konnte.
- In Abhängigkeit von den physiko-chemischen und pharmakologischen Eigenschaften der Mischungskomponenten wurden zwei unterschiedliche Varianten des Biolumineszenz-Hemmtestes mit *Vibrio fischeri*² eingesetzt: der Kurzzeit-Test nach DIN 38412 Teil 34 mit 30 Minuten Inkubationszeit sowie ein Langzeit-Test mit 24 h Expositionsdauer. Aus Gründen, die in Zusammenhang mit der Auswahl von Mischungskomponenten erörtert werden (5.3), wurde der Kurzzeit-Test für die Prüfung eines Referenzgemisches *ähnlicher* Wirkung und der Langzeit-Test für ein Testgemisch *unähnlicher* Wirkung verwendet.

Merkmale und Durchführung dieser Biotests sind in Abschnitt 6.2 dargelegt.

5.2 Testgemische

Testgemische sind durch Art und Anzahl der Mischungskomponenten, deren Mischungsverhältnis sowie ihre Gesamtkonzentration definiert. Bei der experimentellen Analyse der Toxizität von Gemischen wurden die ersten drei Parameter jeweils konstant gehalten, während die Gesamtkonzentration die variable Größe darstellte (Konzentrations-Wirkungsanalyse von Stoffgemischen). Dieses sog. *fixed ratio design* gestattete den statistisch gestützten Vergleich von Beobachtungswerten mit beiden Vorhersagen (KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG).

Hinsichtlich der Art der Mischungskomponenten ergab sich aus der Zielsetzung die unabdingbare Anforderung, daß den beteiligten Stoffen nach Stand des Wissens und konsensfähigen Kriterien entweder identische (Referenzgemische) oder klar abgrenzbare, spezifische, molekular definierte und im jeweiligen Testorganismus relevante Wirkungsmechanismen eindeutig zugeordnet werden können. Eine stringente Erfüllung dieser An-

¹ früher *Chlorella fusca* var. *vacuolata*

² früher *Photobacterium phosphoreum*

forderung gestaltet sich allerdings um so schwieriger, je größer die Anzahl der Mischungskomponenten sein soll. Eine effiziente Vorgehensweise bei der Auswahl von Mischungskomponenten mußte sich deshalb an Zielvorgaben für deren Mindestanzahl orientieren.

Für die Ableitung dieser Vorgaben waren zwei Gesichtspunkte maßgeblich:

- Zum einen galt es, Testsituationen zu realisieren, in denen Mischungskomponenten in jeweils nicht signifikant wirksamen Einzel-Konzentrationen vorliegen (EC_{01} als NOEC-Operationalisierung), die Vorhersagekonzepte aber einen deutlichen Gesamteffekt des Gemisches prognostizieren lassen.
- Zum anderen sollten beide Vorhersagen möglichst unterschiedlich sein, um eine differenzierte Beurteilung des Prognosewertes zu ermöglichen.

Wieviele Mischungskomponenten zur Erfüllung dieser verknüpften Anforderungen erforderlich sind, hängt von der Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven der Einzelsubstanzen und vom Mischungsverhältnis ab. An vorhandenen Datensätzen aus Vorläufer-Projekten wurden deshalb Steilheitsanalysen vorgenommen und mit diesen Erfahrungswerten Simulationsrechnungen durchgeführt. Sie führten zu dem Ergebnis, daß die Zielrealisierung mit weniger als 10 Mischungskomponenten keinesfalls gewährleistet werden konnte, und daß mit 15 bis 20 Mischungskomponenten gute Erfolgsaussichten gegeben waren. Unter diesen Vorgaben wurden Verfahrens-Schemata für die Stoffauswahl festgelegt (s. 6.1). Innerhalb eines fixen Zeitrahmens gelang es damit, 14 bis 18 geeignete Mischungskomponenten für jedes der vier Testgemische zu identifizieren.

Jedes Testgemisch wurde in zwei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen geprüft, und zwar im Verhältnis der EC_{50} -Werte und im Verhältnis der EC_{01} -Werte der Einzelsubstanzen. Dafür waren zwei Gründe ausschlaggebend:

- Erstens kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität vom Mischungsverhältnis der Komponenten abhängig ist.
- Zweitens hat das Mischungsverhältnis sowohl Einfluß auf die Unterschiedlichkeit der Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG als auch auf die Differenz zwischen Einzelstoff-Toxizität und prognostizierter Mischungstoxizität.

Die Kombination von Testsubstanzen im Verhältnis ihrer EC_{50} -Werte ist ein gängiges Verfahren in der Kombinations-Wirkungsanalytik (s. 3.5). Es ist leicht nachvollziehbar und stellt nur geringe Ansprüche an die Datenqualität, wenn Beobachtungswerte ausschließlich gegen Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT abgeglichen werden sollen. Für die Analyse des Beitrages niedriger Effekt-Konzentrationen von Einzelstoffen zur Gesamt-Toxizität birgt es allerdings gravierende Nachteile (s. 6.3.2). Sie erwachsen daraus, daß gleiche Fraktionen des EC_{50} bei unterschiedlich steilen Konzentrations-Wirkungskurven zu ganz unterschiedlichen Einzeleffekten führen. Simulationsrechnungen führten zu dem Schluß, daß die Beantwortbarkeit der Fragestellung mit diesem Mischungsverhältnis nicht sichergestellt werden konnte. Sie zeigten aber auch, daß dieser Mangel bei Verwendung eines EC_{01} -Verhältnisses überwindbar sein würde.

5.3 Mischungskomponenten

Stoffe, die für die Bildung der Testgemische in Frage kamen, müssen zwei Grundforderungen erfüllen:

- Sie müssen einen bekannten, im jeweiligen Testorganismus relevanten spezifischen Wirkungsmechanismus aufweisen.
- Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung muß vollständig und valide bestimmbar sein.

Wirkungsmechanismen wurden als molekulare "Wirkorte" definiert und gegeneinander abgegrenzt. Diese Wirkorte sind entweder strukturell benennbar (z.B. ein bestimmtes Enzym) oder zumindest funktionell als Störung eines Stoffwechselprozesses eng umrissen (z.B. protonophore Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung). Wegen des heterogenen Erkenntnisstandes können unterschiedliche Wirkorte nicht immer mit der gleichen Präzision definiert werden. Für die Zusammensetzung von Gemischen *unähnlicher* Wirkung war es jedoch hinreichend, wenn nach Stand des Wissens ausgeschlossen werden kann, daß die primäre Interaktion identische oder überlappende Wirkorte betrifft. Die Erfordernis eines spezifischen Wirkungsmechanismus beinhaltet, daß gleichzeitige indirekte Effekte weitestmöglich auszuschließen waren. Solche indirekten Effekte können sich insbesondere ergeben aus

- der physiko-chemischen Reagibilität mit anderen Komponenten des Gemisches oder des Testmediums,
- der Veränderung des pH-Wertes des Testmediums durch Säuren oder Basen,
- die Lichtabsorption durch farbige Substanzen.

Hinter der Erfordernis einer vollständigen und validen Bestimmbarkeit der Konzentrations-Wirkungsbeziehung jeder Einzelsubstanz verbirgt sich ein ganzer Katalog von Teilanforderungen. Grundvoraussetzungen waren die kommerzielle Verfügbarkeit analysen-reiner Substanz-Standards sowie analytischer Verfahren zur Validierung der Testkonzentrationen und der Konzentrations-Stabilität. Weiterhin mußte die in den Testmedien lösliche Konzentration mindestens einen 80 %igen Effekt auslösen. Dies stellt zwar eine Abschwächung des "Vollständigkeits"-Kriteriums dar. Diese ist jedoch unbedeutend, da sehr hohe Einzelstoff-Effekte für die in Frage stehenden Kombinations-Effekte irrelevant sind und die statistische Modellierung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung im Bereich geringer Effekte durch das eventuelle Fehlen von Datenpunkten zwischen 80 und 100 % nicht beeinträchtigt wird (s. 6.3.1). Gewährleistet werden mußte zudem eine hohe Konstanz der Testkonzentrationen während der Testdauer. Thermische, hydrolytische und photolytische Stabilität, Flüchtigkeit und Biotransformationspotential waren daher bei der Stoffauswahl in Betracht zu ziehen. Schließlich impliziert die Anforderung einer "validen" Bestimmbarkeit von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen auch das Streben nach minimaler Varianz und maximaler Reproduzierbarkeit. Erfahrungsgemäß werden diese Größen nicht nur durch die Gestaltung der Biotests bestimmt (s. 5.1), sondern stellen sich auch als Charakteristika von Substanzen oder Substanzgruppen dar.

Insofern verschiedene Substanzen den gleichen Wirkungsmechanismus repräsentieren und den genannten Anforderungen gleich gut genügen, wurden die Steilheit der Konzen-

trations-Wirkungsbeziehung und die Gewässerrelevanz der Stoffe als Auswahlkriterien herangezogen: die Steilheit wegen ihrer Bedeutung für die Zielrealisierung mit einer begrenzten Anzahl von Mischungskomponenten (s. 5.2), die Gewässerrelevanz wegen des unmittelbaren Bezugs zur Problemstellung (s. Abschnitt 2).

Die gewählte Vorgehensweise bei der anforderungsgerechten Auswahl von Mischungskomponenten, im Detail erforderliche Präzisierungen oder Einschränkungen der Anforderungen und im Einzelfall ausschlaggebende Entscheidungsgründe sind in Abschnitt 6.1 dokumentiert. Im Ergebnis wurden Testgemische *unähnlicher* Wirkung vorwiegend aus Substanzen zusammengesetzt, die als Herbizide, Fungizide, Antibiotika oder Chemotherapeutika praktische Verwendung finden. Das Referenzgemisch *ähnlicher* Wirkung bestand im Algentest aus *s*-Triazinen, die spezifisch den Elektronentransport im Photosystem II (PS II) inhibieren. Im Leuchtbakterientest wurden statt dessen substituierte Phenole und Aniline verwendet, die als protonophore Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung wirken.

Entkoppler entfalten ihre volle Wirksamkeit im Leuchtbakterientest bereits in Minuten. Bei langer Testdauer kann hingegen die mehr oder weniger ausgeprägte Flüchtigkeit der Verbindungen experimentelle Probleme bereiten. Für die Kombinations-Wirkungsanalyse dieses Referenzgemisches wurde deshalb der Kurzzeit-Biolumineszenz-Hemmtest gewählt (30 Min.). Die Realisierung eines multiplen Testgemisches *unähnlicher* Wirkung war hingegen nur bei Verwendung der Langzeit-Variante des Biolumineszenz-Hemmtestes möglich (24 h). Der Grund dafür ist, daß die Wirkung verschiedener spezifischer Inhibitoren bakterieller Biosynthesewege erst bei längerer Expositionsdauer zum Tragen kommt (s. 6.1.2).

5.4 Experimentelle Konzentrations-Wirkungsanalyse

Kennzahlen der experimentellen Konzentrations-Wirkungsanalytik sind die Anzahl der Testkonzentrationen sowie der Replikate und Kontrollen. Die daran zu stellenden Anforderungen ergaben sich aus den eingesetzten biometrischen Verfahren der Konzentrations-Wirkungsanalyse in Zusammenhang mit der Varianz der eingesetzten Biotests. Die Wahl der biometrischen Verfahren bestimmt sich ihrerseits aus den Zielsetzungen des Projektes. Diese wechselseitigen Bedingungen sind in Abschnitt 6.3 detailliert dargelegt. Sie führten zu den Mindestanforderungen von 11 Testkonzentrationen, 3 Replikaten je Konzentrationsstufe sowie 3 x 4 Kontrollen im Algentest, bzw. 3 x 3 Kontrollen im Leuchtbakterientest.

Verdünnungsreihen mit fixem Verdünnungsfaktor, wie sie in normierten Biotests üblich sind, führen je nach Steilheit und Form zu unterschiedlich guten oder schlechten Beschreibungen von Konzentrations-Wirkungskurven. Für die Zielsetzungen des Projektes waren höhere Anforderungen zu stellen. Testkonzentrationen waren deshalb in Anpassung an den Verlauf der jeweiligen Konzentrations-Wirkungskurve flexibel abzustufen, so daß mindestens der Bereich von EC_{01} bis EC_{80} durch das Datenmaterial möglichst gut

erfaßt wird. Dies setzte orientierende Versuche zu Lage und Form der Konzentrations-Wirkungskurve voraus. Diese orientierenden Versuchsreihen lieferten gleichzeitig Anhaltspunkte für eine hinreichende Reproduzierbarkeit der Konzentrations-Wirkungskurven.

Im Rahmen der technischen Möglichkeiten wurden die o.g. biometrischen Mindestanforderungen so heraufgesetzt, daß eine valide Bestimmbarkeit der Konzentrations-Wirkungsbeziehung auch im Falle technischer Ausfälle einzelner Versuchsansätze oder nicht ganz optimal gewählter Konzentrationsstufen weitgehend sichergestellt war. Tab. 5.2 gibt deshalb den experimentellen Ansatz mit 12 Konzentrationsstufen und 6 Kontrollen in je 3 Replikaten für den Algentest, bzw. 3 x 16 Konzentrationsstufen und 3 x 4 Kontrollen im Leuchtbakterientest an. Durch begleitende Analytik waren die Testkonzentrationen und ihre Stabilität während der Testdauer zu validieren. Applikationstechniken waren ohne den Einsatz zusätzlicher Lösungsvermittler zu gestalten. Details des experimentellen Designs sind in Abschnitt 6.2 dokumentiert.

5.5 Biometrische Konzentrations-Wirkungsanalyse

Vorhersagen der Toxizität multipler Gemische und der Vergleich dieser Vorhersagen mit Beobachtungswerten mußten auf statistisch valide Modellierungen von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen sowie auf statistisch valide Schätzungen von Effekt-Konzentrationen und deren Unsicherheiten gegründet werden. Entsprechend den Zielsetzungen des Projektes galt dies insbesondere für den Bereich niedriger Effekte bzw. Effekt-Konzentrationen. Aus Gründen, die in Abschnitt 6.3.1 dargelegt sind, waren symmetrische oder asymmetrische sigmoide Kurvenverläufe parametrisch zu modellieren. Schätzverfahren mußten der Tatsache Rechnung tragen, daß die Beobachtungsvariabilität in den verwendeten Biotests vom Effektniveau abhängig ist (sog. Heteroskedasizität). In der aquatischen Toxikologie bisher gebräuchliche Verfahren erfüllen diese Anforderungen nicht hinreichend und entsprechen nicht dem Stand der biometrischen "Kunst".

Für die Realisierung der Projektziele wurde deshalb in erheblichem Umfang biometrische Verfahrensentwicklung geleistet. Ergebnis ist eine Prozedur, die als *Best Fit Modeling* gekennzeichnet werden kann. Aus einem "Pool" von 10 verschiedenen 2- und 3-parametrischen Regressions-Modellen wird dasjenige ausgewählt, das einen Datensatz jeweils am besten beschreiben läßt. Zur Anpassung wird ein GLS-Verfahren (*generalized least square*) mit robuster nicht-parametrischer Gewichtsschätzung verwendet. Die Beurteilung der Anpassungsgüte erfolgt nach dem SAE-Kriterium (*sum of absolute errors*) in Verbindung mit einer Residuenanalyse. Effekt-Konzentrationen und zugehörige Unsicherheiten werden mit sog. *Resampling*-Verfahren (*bootstrap*) bestimmt. Die genannten Verfahren sind in 6.3.1 erläutert und begründet.

5.6 Operationalisierung der NOEC

In Abschnitt 3.3 wurde dargelegt, daß sog. *No Observed Effect Concentrations* (NOEC's) für die Prüfung des Vorhersagewertes des Konzeptes der *Unabhängigen Wirkung* ungeeignete Kenngrößen sind. Ersatzweise wurde eine *Benchmark*-Konzentration von 1 % (EC_{01}) verwendet. Das experimentelle Design (s. 5.4) war darauf abgestimmt, diese EC_{01} mit den in Abschnitt 5.5 umrissenen Verfahren der biometrischen Konzentrations-Wirkungsanalyse valide bestimmen zu können.

Zum Vergleich wurden NOEC-Werte von Einzelstoffen und Gemischen "klassisch" varianzanalytisch geschätzt. Dazu wurde der DUNNETT-Test verwendet, da dieser für die Risikobewertung im Rahmen des Europäischen Chemikalienrechts derzeit empfohlen wird (s. 6.3.1). Es konnte erwartet werden, daß die so bestimmten NOEC-Werte jeweils größer sind als die EC_{01} . Die EC_{01} war somit als eine adäquate Operationalisierung der NOEC qualifizierbar.

5.7 Vergleich mit Vorhersagen

Bisher durchgeführte Vergleiche der aquatischen Toxizität multipler Stoffgemische mit Vorhersagen (s. 3.5)

- haben sich meist nur auf eines der beiden Vorhersagekonzepte bezogen (nämlich KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT),
- waren auf ein einziges Effektniveau beschränkt (meist EC_{50}) und
- haben keine statistische Absicherung der Resultate vorgenommen.

Die Zielsetzungen des Vorhabens erforderten eine Überwindung dieser Schwächen in allen drei Punkten. Statistisch gestützte Vergleiche beobachteter Konzentrations-Wirkungskurven von Gemischen mit Prognosen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG sollten möglichst "global", mindestens jedoch im Bereich von EC_{10} bis EC_{80} durchgeführt werden. Differenzen zwischen beobachteter und prognostizierter Mischungstoxizität waren zu quantifizieren und auf statistische Signifikanz zu prüfen.

Entsprechende Umsetzungen der Vorhersage-Konzepte in Verfahren der praktischen Datenauswertung sowie geeignete Methoden der statistischen Signifikanzprüfung waren bislang allerdings nur für Zwei-Stoff-Gemische entwickelt worden. Für die biometrische Auswertung multipler Kombinations-Wirkungsversuche waren deshalb erhebliche methodische Entwicklungsarbeiten zu leisten. Sie werden in Abschnitt 6.3.2 dargestellt.

Für die vergleichende Beurteilung des Prognosewertes verschiedener Konzepte ist ein quantitatives Maß der "Prognose-Genauigkeit" erforderlich. Dieses muß Über- und Unterschätzungen der tatsächlichen Toxizität auf einer einheitlichen Skala in direkt vergleichbaren Maßzahlen ausdrücken lassen. Als ein entsprechend taugliches Maß ist der *Index on Prediction Quality* (IPQ) definiert worden (Grimme et al. 1994, Altenburger et al. 1996).

Als wesentliche methodische Weiterentwicklung wurde in diesem Vorhaben ein Verfahren zur Berechnung von Konfidenzintervallen für IPQ-Werte erarbeitet. Diese Konfidenzintervalle liefern eine Grundlage für die Beurteilung der Vorhersage-Unschärfe und somit auch für die Frage, ob Über- oder Unterschätzungen der Mischungstoxizität durch Prognose-Konzepte statistisch signifikant sind. Der IPQ wird in Abschnitt 6.3.2 erläutert und für die Visualisierung von Ergebnissen in den Abschnitten 7 und 8 verwendet.

6 Verfahren und Methoden

In diesem Kapitel werden die Verfahren zur Auswahl von Mischungskomponenten (Abschnitt 6.1), die experimentellen Methoden zur Bestimmung der Toxizität von Einzelstoffen und Mischungen (Abschnitt 6.2) sowie die biometrischen Auswerteverfahren (Abschnitt 6.3) dargestellt. Welche Anforderungen an diese Verfahren und Methoden zu stellen waren, welche Gesichtspunkte für ihre Gestaltung und Durchführung ausschlaggebend waren und welche Entwicklungsarbeiten dabei geleistet wurden, ist im vorangehenden Abschnitt 5 zusammenfassend dargelegt worden.

6.1 Auswahl von Mischungskomponenten

Aufgrund der unterschiedlichen Physiologie der verwendeten Testorganismen mußten für jeden Biotest separat Mischungskomponenten mit *unähnlicher* Wirkung sowie je ein Referenz-Set von Stoffen mit *ähnlicher* Wirkung bestimmt werden. Entsprechend den in Abschnitt 5.2 entwickelten Zielvorgaben waren für jedes dieser Gemische mindestens 10, besser 15 bis 20 Substanzen zu identifizieren, die dem in Abschnitt 5.3 dargelegten Anforderungskatalog entsprachen.

In Anbetracht der Problemstellung (s. Abschnitt 2) war es wünschenswert, bei der Konzeption von Testgemischen vor allem solche Substanzen zu berücksichtigen, deren faktische Gewässerrelevanz in der Bundesrepublik entweder durch Befunde in Monitoring-Programmen belegt ist, oder aufgrund ihrer Nennung in einschlägigen Stofflisten nach Expertenmeinung zumindest angenommen werden kann. Um die Realisierungsmöglichkeiten abzuklären, wurde zunächst für 185 Substanzen, für die Gewässerbefunde vorliegen (Herrchen, Diedrich, Ludwig 1995, LUA NRW 1996a-c), geprüft, inwieweit sie eindeutig abgrenzbaren, spezifischen Wirkungsmechanismen in Algen oder Bakterien sicher zugeordnet werden können.

Die Mehrzahl dieser Chemikalien mußte nach aktuellem Stand des Wissens allerdings als Substanzen mit unspezifischen oder unbekanntem Wirkungsmechanismen oder als "multi-site"-Inhibitoren eingestuft werden. Immerhin konnten 37 Wirkstoffe identifiziert werden, die für die Konzeption der Testgemische im Algentest in Frage kamen (s. Anhang A3.1). Sie repräsentieren allerdings nur 7 verschiedene spezifische Wirkungsmechanismen und boten somit zumindest für die Zusammenstellung eines Testgemisches *unähnlicher* Wirkung keine ausreichende Grundlage.

Völlig unzulänglich aber fiel die "Ausbeute" vor allem im Hinblick auf die geplanten Tests an Leuchtbakterien aus, und das auch, nachdem 90 weitere Substanzen in Betracht gezogen worden waren, für die zwar keine Befunde in deutschen Oberflächengewässern vorliegen, die aber von der IKSR (Internationale Kommission zum Schutz des Rheins) als "betrachtungswürdig" eingestuft werden (IKSR 1993). Aus der sich ergebenden Liste von

insgesamt 275 Umweltchemikalien konnten ganze 9 Substanzen einem bekannten spezifischen, in Bakterien relevanten Wirkort eindeutig zugeordnet werden. Sie repräsentieren 5 differenzierbare Wirkungsmechanismen (Anhang A4.1).

Unter diesen Bedingungen konnte "Gewässerrelevanz" im Sinne "harter" Expositionsdaten oder -abschätzungen nicht zum bindenden Kriterium der Stoffauswahl gemacht werden. Sie wurde "soweit als möglich" berücksichtigt. Nichtsdestoweniger stellen die letztendlich ausgewählten Mischungskomponenten, wie später im Einzelnen dargelegt, aufgrund der Verwendungsart und der Einsatzmengen in Verbindung mit ihren toxikologischen Eigenschaften ein erhebliches Gefährdungspotential für aquatische Systeme dar.

Nachdem sich Listen "gewässerrelevanter" Stoffe als unzureichende Ausgangsbasis für die Konzeption der Testgemische erwiesen hatten, mußten andere, erfolgreichere Vorgehensweisen gefunden werden. Für die Realisierung der Vorhabensziele kam es dabei allein darauf an, eine ausreichende Anzahl anforderungsgerechter Komponenten für jedes der Testgemische möglichst rationell zu identifizieren. Eine strikte Einheitlichkeit der Vorgehensweise oder gar der Anspruch, alle möglicherweise geeigneten Substanzen vollständig zu erfassen, waren dabei weder erforderlich noch effizient. Je nach Testgemisch führten etwas unterschiedliche Wege zum Ziel. Sie folgen allerdings alle einem gemeinsamen Grundschemata:

1. Erstellung ein oder mehrerer Auswahllisten spezifisch wirkender Substanzen,
2. Selektion von "Kandidaten" (Substanzen, die in ausreichender Reinheit verfügbar sind und die nach Literaturdaten, theoretischen Überlegungen oder eigenen Erfahrungswerten den Anforderungen am ehesten entsprechen oder entsprechen könnten),
3. Experimentelle Vorprüfung dieser "Kandidaten" (Löslichkeit, Wirksamkeit, Analyseverfahren, Stabilität, Varianz, Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurve),
4. Entscheidung über die Verwendung.

Nur der Zeitrahmen, aber weder die Auswahllisten noch die Listen der daraus selektierten Kandidaten mußten dabei a priori fixiert werden. Schrittweises Ergänzen und wiederholtes Durchlaufen des Schemas mit zusätzlichen Substanzen erwiesen sich als die effektivere Strategie. Experimentelle Prüfungen wurden stufenweise organisiert und abgebrochen, wenn eine Substanz eine der unabdingbaren Anforderungen eindeutig nicht erfüllte.

Die konkreten Vorgehensweisen bei der Selektion der Mischungskomponenten und ihre Ergebnisse werden nachfolgend zuerst für die Gemische *ähnlich* wirkender Substanzen (6.1.1) und dann für die Testgemische *unähnlich* wirkender Substanzen (6.1.2) dokumentiert.

6.1.1 Ähnlich wirkende Mischungskomponenten

Selektion ähnlich wirkender Mischungskomponenten für den Algentest

37 von 185 Stoffen, die als Kontaminantien von Oberflächengewässern in Deutschland nachgewiesen sind, weisen einen spezifischen Wirkungsmechanismus auf, der in Algen relevant ist (s.o.). 24 dieser 37 Umweltchemikalien sind spezifische Inhibitoren des Photo-

systems II (s. Anhang A3.1), die als Wirksubstanzen von Herbiziden verwendet werden. Ein Referenzgemisch *ähnlicher* Wirkung aus Vertretern dieses Wirkungstyps zu bilden, bot sich damit geradezu zwingend an. Die 24 Photosynthese-Hemmer lassen sich 6 verschiedenen chemischen Stoffklassen zuordnen. Triazine bilden dabei mit 11 von 24 Stoffen die größte Gruppe (Anhang A3.1). Gleichzeitig stellen diese 11 in Gewässern nachgewiesenen Triazine nur einen Ausschnitt aus dieser Substanzgruppe dar. Zahlreiche weitere Vertreter weisen den gleichen Wirkungsmechanismus auf und werden ebenfalls als Herbizide eingesetzt. Damit eröffnete sich die Möglichkeit, das Referenzgemisch aus solchen Substanzen zu bilden, die nicht nur einen identischen Wirkungsmechanismus, sondern auch eine identische chemische Grundstruktur aufweisen (Congenerizität) und damit auch unter QSAR-Gesichtspunkten als *strikt ähnlich* einzustufen sind (vergl. 3.4). In Ergänzung der 11 faktisch gewässerrelevanten Triazine wurden deshalb 15 weitere wirkungs- und strukturähnliche Substanzen in Betracht gezogen, so daß sich eine Auswahlliste mit insgesamt 26 Stoffen ergab (Anhang A1.1).

Für alle 26 Substanzen dieser Auswahlliste wurde eine experimentelle Vorprüfung durchgeführt. Sie führte in allen Fällen zu einer positiven Beurteilung der Eignung. Die Prüfung der Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven zeigte gleichzeitig, daß ein Gemisch aus 15 bis 20 dieser Substanzen ausreichende Erfolgsaussichten für die Beantwortbarkeit der Fragestellung bot (s. 5.2). Zur Eingrenzung wurde deshalb das Congenerizitäts-Kriterium sehr eng formuliert. 6 Substanzen, die der in Anhang A1.1 angegebenen s-Triazin-Grundstruktur nicht entsprachen, wurden ausgeschlossen. Unter Handhabungsgesichtspunkten wurden zwei weitere Substanzen ausgeschlossen, die nicht als kristalline Reinsubstanzen, sondern nur als niedrig-konzentrierte Lösungen in Cyclohexan im Handel verfügbar waren. Das Resultat der Stoffauswahl ist somit eine Liste von 18 strikt congeneren s-Triazinen, die als Komponenten des multiplen Referenzgemisches strikt wirkungs-*ähnlicher* Substanzen im Algentest eingesetzt wurden. Sie sind in Anhang A1.2 spezifiziert.

Selektion ähnlich wirkender Mischungskomponenten für den Leuchtbakterientest

Für das Referenzgemisch *ähnlich* wirkender Stoffe im Leuchtbakterientest mußten 15-20 Stoffe mit antizipiert gleicher Wirkung identifiziert werden. Bei der Analyse der als gewässerrelevant erkannten Stoffe mit bekanntem, spezifischem, in Bakterien relevantem Wirkungsmechanismus (s. Anhang A4.1) kann von den 5 gekennzeichneten Wirkorten lediglich für den Wirkungsbereich der Protonentranslokation und ATP-Synthese davon ausgegangen werden, daß eine hinreichend große Zahl von Stoffen zur Verfügung steht. Für diese Gruppe der als protonophore Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung benennbaren Stoffe konnten 30 Substanzen für die experimentelle Testung in Betracht gezogen werden (s. Anhang A2.1). Von diesen Stoffen waren zwei (4-Chlor-2,6-dinitroanilin und 6-Chlor-2,4-dinitroanilin) kommerziell nicht verfügbar. Vier weitere Substanzen (Dinitro- und Tetrachloraniline) ließen im löslichen Bereich (in 2 % NaCl-Lösung) mittels quantitativer Struktur-Wirkungsbeziehung (QSAR) abgeschätzter akuter Leuchtbakterientoxizität (Schulz und Cronin 1997) keine hinreichende Wirksamkeit erwarten und wurden daher nicht weiter untersucht. Von den restlichen 24 Stoffen schieden die Tetrachlorphenole, Pentabromphenol, die Dichlornitroaniline, Pentachlorpyridin und Tetrachlorcatechol aufgrund unzureichender Wirksamkeit im experimentellen Screening mit dem

Kurzzeit-Leuchtbakterientest aus der weiteren Bearbeitung aus. Es verblieben siebzehn Substanzen, von denen eine (2,4,5-Trichlorphenol) aufgrund von Zeitmangel nur im Wirksamkeitsscreening bearbeitet wurde.

Die letztlich der Einzelstofftestung unterzogenen 16 Substanzen mit antizipiert gleichem Wirkmechanismus, nämlich Entkopplung der ADP-Phosphorylierung vom oxidativen Elektronentransport, sind in Anhang A2.2 dokumentiert. Für die Dinitroverbindungen gilt dabei die Besonderheit zu beachten, daß diese Verbindungen aufgrund ihrer explosionsgefährdenden Eigenschaften zwar als Reinstoffe, aber nur in befeuchtetem Zustand verfügbar sind.

6.1.2 Unähnlich wirkende Mischungskomponenten

Ein für die Anforderungen dieses Projektes ausreichender Stand des Wissens um unterschiedliche spezifische, in Algen oder Bakterien relevante Wirkungsmechanismen ist nur bei solchen Substanzen gegeben, die als Pestizide, Pharmaka oder sog. "Tools" der physiologischen Forschung Verwendung finden. Die Vorgehensweise bei der Erstellung von Auswahllisten potentiell geeigneter Substanzen mußte deshalb in einem "Screening" des entsprechenden "Standes gesicherten Lehrbuchwissens" bestehen.

Wird ein multiples Gemisch ausschließlich aus Substanzen zusammengesetzt, die alle jeweils unterschiedliche spezifische Wirkungsmechanismen aufweisen, so kann diesem Gemisch eine einzige weitere Substanz hinzugefügt werden, die keinen spezifischen Wirkort aufweist, ohne daß dadurch die Anforderung strikt *unähnlicher* Wirkung verletzt würde. Mit dem Ziel, die Anzahl der Mischungskomponenten zu maximieren, wurde von dieser Möglichkeit Gebrauch gemacht. In Ergänzung der spezifisch wirkenden Substanzen, deren Auswahl nachfolgend dargelegt wird, wurden die Testgemische *unähnlicher* Wirkung jeweils noch um ein kationisches Tensid erweitert. Dessen *unspezifische* Wirkung auf biologische Membranen konnte in jedem Falle als *unähnlich* von allen anderen Mischungskomponenten differenziert werden.

Selektion unähnlich wirkender Mischungskomponenten für den Algentest

Als Ausgangsbasis für die Identifizierung geeigneter Komponenten mit *unähnlicher* Wirkung im Algentest wurden drei Stofflisten erstellt. Die Substanzen in diesen Listen sind nach Wirkorten gruppiert. Diese Wirkorte sind so definiert, daß sie alle eindeutig voneinander abgrenzbar sind (vergl. 5.3). Es sind nur solche Substanzen aufgelistet, die nach Stand des Wissens eindeutig und ausschließlich einem dieser Wirkorte zugeordnet werden können.

- Liste 1 enthält in der Bundesrepublik faktisch gewässerrelevante Substanzen mit spezifischen Wirkungsmechanismen in Algen. Sie umfaßt 37 Stoffe mit 7 unterschiedlichen Wirkorten. Ihre Erstellung wurde bereits erläutert (s. 6.1). Sie ist als Anhang A3.1 dokumentiert.
- Liste 2 enthält Wirksubstanzen von Herbiziden und Fungiziden. Zur Erstellung dieser Liste wurden alle Stoffe in Betracht gezogen, die nach Tomlin (1994) entsprechende

kommerzielle Verwendung finden. Für jeden einzelnen wurde die mögliche Zuordnung zu einem spezifischen Wirkungsmechanismus geprüft. Die Entscheidung mußte dabei notwendigerweise auf wenige ausgewählte Übersichtsarbeiten gegründet werden. Im Falle der Herbizide wurde sie auf Hock, Fedtke und Schmidt (1995), im Falle der Fungizide auf Lyr (1995) gestützt. Als Resultat enthält die Liste 189 Substanzen mit 18 verschiedenen Wirkorten. Sie ist als Anhang A3.2 dokumentiert.

- Liste 3 enthält Substanzen, die als "Tools" der pflanzenphysiologischen Forschung Verwendung finden. Maßgebliche Quelle sowohl für die Substanzen als auch für die Zuordnung zu Wirkungsmechanismen war Hock (1995). Die Auswertung ergab 154 Stoffe mit 41 verschiedenen spezifischen Wirkungsmechanismen. Die meisten dieser Substanzen werden auch außerhalb der Forschung, insbesondere als Antibiotika oder Chemotherapeutika verwendet. Die Liste findet sich als Anhang A3.3.

Es ergab sich, daß Liste 2 sämtliche Wirkorte aus Liste 1 einschließt. Vier Wirkorte werden durch Substanzen aus Liste 2 und 3 gleichermaßen repräsentiert. Zusammengefaßt standen 346 Substanzen mit 55 verschiedenen Wirkorten zur Auswahl.

Nach Prüfung der kommerziellen Verfügbarkeit sowie Literaturangaben zu den bei der Auswahl zu berücksichtigenden Gesichtspunkten (s. 5.3) erfolgte eine Eingrenzung auf 27 Wirkungsmechanismen. Für jeden wurden ein oder mehrere stellvertretende Substanzen ausgewählt, insgesamt 40 "Kandidaten" (Anhang A3.4). Für diese wurde eine experimentelle Vorprüfung durchgeführt. Für 15 verschiedene Wirkungstypen konnte jeweils ein Vertreter identifiziert werden, der den Anforderungskatalog erfüllte. Alle anderen "Kandidaten" erwiesen sich als ungeeignet oder zumindest weniger geeignet als andere Vertreter des jeweils gleichen Wirkungsmechanismus und wurden deshalb ausgeschlossen. Die ausschlaggebenden Gründe sind in Anhang A3.4 dokumentiert.

Einige der verbleibenden Substanzen waren zwar als prinzipiell geeignet, aber dennoch kritisch anzusehen. Gründe dafür waren Biotransformierbarkeit durch Algen (Norflurazon¹), Hydrolyse-Instabilität (Metsulfuron-methyl²) oder Farbigkeit (Aclonifen und CCCP). Nach eingehender Prüfung konnte jedoch sichergestellt werden, daß diese Punkte unter den gewählten Testbedingungen irrelevant sind. Für zwei Substanzen (Azaserin und Streptomycin) standen keine geeigneten chemischen Analyseverfahren zur Verfügung. Diese Schwierigkeit konnte durch eine biologische Kontrolle der Konzentrations-Stabilität unter Testbedingungen überwunden werden (s. Abschnitt 6.2). Entsorgungsprobleme beim kanzerogenen Azaserin wurden durch 48-stündige Säurebehandlung aller Proben (hydrolytische Abspaltung der Azogruppe) und anschließende Neutralisation mit NaOH gelöst.

Resultat des Auswahlverfahrens war also eine Liste von 15 Stoffen mit *unähnlichen* spezifischen Wirkungsmechanismen in Algen. Diese wurde durch ein kationisches Tensid auf 16 Substanzen aufgestockt (s.o.). Aufgrund von Vorerfahrungen (Grimme et al. 1994) wurde dazu Dodecyltrimethyl-ammoniumchlorid (kurz QAC-12) gewählt. Alle abschließend ausgewählten Mischungskomponenten sind in Anhang A3.5 spezifiziert.

¹ s. Tantawy, Braumann und Grimme 1984

² s. Berger und Wolfe 1996

Selektion unähnlich wirkender Mischungskomponenten für den Leuchtbakterientest

Als Ausgangsbasis für die Identifizierung geeigneter Komponenten mit *unähnlicher* Wirkung im Leuchtbakterientest wurden zwei nach Wirkorten gruppierte Stofflisten erstellt. An die Definition und Abgrenzbarkeit der Wirkungsmechanismen sowie die Eindeutigkeit der Zuordnung wurden die gleichen Maßstäbe angelegt wie bei der Auswahl für den Algentest (s.o.).

- Liste 1 enthält in der Bundesrepublik faktisch oder nach IKSR-Einstufung gewässer-relevante Substanzen mit spezifischen Wirkungsmechanismen in Leuchtbakterien. Sie umfaßt 9 Substanzen mit 5 unterschiedlichen Wirkorten. Sie wurde bereits unter 6.1 erläutert und ist als Anhang A4.1 dokumentiert.
- Liste 2 enthält Wirkstoffe, die als Pestizide, Antibiotika, Chemotherapeutika oder "Tools" der physiologischen Forschung verwendet werden. In Betracht gezogen wurden derartige Substanzen, soweit sie bei Tomlin (1994), Alexander, Estler und Legler (1995), Auterhoff, Knabe und Höltje (1991) oder Hock (1995) genannt sind. Die Zuordnung zu bakterien-relevanten Wirkungsmechanismen wurden ebenfalls auf Alexander, Estler und Legler (1995), Auterhoff, Knabe und Höltje (1991) und Hock (1995) sowie zusätzlich O'Grady et al. (1997) gestützt. Im Ergebnis konnten 205 verschiedene Substanzen identifiziert werden, die jeweils einem von 37 unterschiedlichen Wirkorten in Bakterien eindeutig zugeordnet werden können. Diese sind in Anhang A4.2 aufgelistet.

Es ergab sich, daß 4 Wirkorte und 3 Substanzen in beiden Listen vertreten sind. Zusammenfassend standen also 212 Substanzen zur Auswahl, die 37 verschiedene Wirkungsmechanismen repräsentieren.

Die Mehrzahl dieser Wirkungsmechanismen, nämlich 23 von 37, betreffen Biosyntheseprozesse, deren Beeinträchtigung nur bei ausreichend langer Expositionszeit als toxischer Effekt erkennbar wird. Experimentelle Vorprüfungen konnten die Relevanz dieser Überlegungen für die Art ermittelbarer Kombinationseffekte belegen (Altenburger et al. 1997). Dies führte zu der Konsequenz, alle Arbeiten zum Gemisch *unähnlicher* Wirkung mit der Langzeit-Variante des Biolumineszenz-Hemmtestes durchzuführen (s. 5.1 und 6.2.2).

Um "Kandidaten" für die experimentelle Vorprüfung zu selektieren, wurde für jeden der in Frage kommenden Wirkungsmechanismen überprüft, ob die entsprechenden Stoffe im Chemikalienhandel in hoher Reinheit zu beschaffen sind. Diese Voraussetzung war bei 32 von 37 Wirkungstypen erfüllt. Soweit möglich wurden jeweils zwei verschiedene Vertreter ausgewählt. Es ergab sich eine Liste von 50 "Kandidaten" für die experimentelle Vorprüfung (s. Anhang A4.3).

28 von 50 Stoffen erwiesen sich aus folgenden Gründen als ungeeignete Komponenten eines multiplen Testgemisches:

- *Instabile Testkonzentration:* Stoffe, deren Konzentration unter den Bedingungen des Leuchtbakterientestes innerhalb einer 24-stündigen Inkubationszeit um mehr als 20% abnimmt (Dazomet, Metam, Chlortetracyclin und Tetracyclin).

- *Ungenügende Wirksamkeit:* Stoffe, bei denen im Bereich der maximalen Löslichkeit im Testmedium weniger als 80 % Hemmung zu beobachten war (Chlorsulfuron, Metsulfuron-Methyl, Rotenon, Vinclozolin, Carboxin, Flutolanil, Kresoxim-methyl, Ornidazol, Metronidazol, Sulfadiazin, Sulfacarbamid, Pyrimethamin, Trimethoprim, Fluazifop, Flamprop, Metazachlor, Metolachlor, Fosfomycin, Monensin).
- *Nicht sicher reproduzierbare Konzentrations-Wirkungsbeziehung:* Phenylquecksilberacetat, Jod, Glyphosat, DNOC, Dinoseb.
- *Indirekte Effekte:* Glufosinat wurde wegen seiner Eigenschaft als Chelatbildner und des damit verbundenen chemischen Wechselwirkungspotentials aus der weiteren Testung ausgeschlossen.

Insoweit der erstgeprüfte Vertreter eines Wirkungsmechanismus sich bereits als hinreichend geeignet erwies, wurde auf die weitere Prüfung des jeweiligen alternativen "Kandidaten" verzichtet (Nifedipin, Cordycepin, Benalaxyl, Ofloxacin, Gentamicin, Thiamphenicol, Amoxicillin, Niflumsäure). Probleme der analytischen Nachweisbarkeit von Azaserin und Streptomycin und der Entsorgung der Kanzerogene Azaserin und Actinomycin konnten durch biologische Verfahren der Stabilitätskontrolle (s. 6.2) bzw. deaktivierende Säurebehandlung von Abfällen gelöst werden.

Resultat des Auswahlprozesses war damit eine Liste von 13 Substanzen, die entsprechend den eingangs getroffenen Überlegungen (s.o.) mit Dodecylpyridiniumbromid, einem kationischen Tensid, ergänzt wurde. Die resultierenden 14 Komponenten eines Testgemisches *unähnlicher* Wirkung im Langzeit-Leuchtbakterientest sind in Anhang A4.4 spezifiziert.

6.2 Experimentelle Methoden

Gliederung der experimentellen Arbeiten

Die experimentellen Arbeiten dieses Projektes gliederten sich in 3 Abschnitte:

- *Experimentelle Vorprüfung potentieller Mischungskomponenten im Rahmen der Stoffauswahl* (s. 6.1),
- *Ermittlung von Daten zu den Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der ausgewählten Mischungskomponenten,*
- *Ermittlung von Daten zu den Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der Testgemische.*

Die experimentellen Vorprüfungen bestanden aus einem chemisch-analytischen und einem biologischen Teil. Im analytischen Teil wurden zunächst die erforderlichen Nachweisverfahren erprobt und gegebenenfalls optimiert und dann die Stabilität von Testsubstanz-Konzentrationen unter den Bedingungen des Algen- bzw. Leuchtbakterientestes bestimmt. Im biologischen Teil wurde zuerst geprüft, ob die im jeweiligen Testmedium maximal lösliche Konzentration mindestens 80 % Hemmung der Algenreproduktion bzw. der bakteriellen Biolumineszenz hervorruft. Bei positivem Testergebnis wurden dann orientierende Versuche zu Lage und Steilheit der jeweiligen Konzentrations-Wirkungskurve durchgeführt. Beginnend mit groben Konzentrations-Abstufungen, wurde die Ana-

lyse schrittweise solange verfeinert, bis die Daten die sichere Planung einer "finalen" experimentellen Konzentrations-Wirkungsanalyse von Einzelstoffen gestattete. Im Laufe dieses Prozesses wurden gleichzeitig Anhaltspunkte über Varianz und Reproduzierbarkeit der Toxizitätsdaten gewonnen.

Die experimentelle Ermittlung von Daten zu Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von Einzelstoffen und Mischungen erfolgte entsprechend den in Abschnitt 5.4 festgelegten Anforderungen an Umfang und Qualität des Datenmaterials. Versuchsplanungen wurden im Falle von Einzelstoffen auf biometrische Analysen der Vorprüfungsergebnisse, im Falle von Gemischen auf die Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG gestützt. Gestatteten die Ergebnisse im ersten "Anlauf" noch keine hinreichend sichere Bestimmung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung, wurden Versuchswiederholungen, gegebenenfalls mit veränderter Konzentrationsabstufung durchgeführt. Daraus resultiert, daß das in den Abbildungen des Anhangs D dokumentierte Datenmaterial den festgesetzten Mindestumfang in vielen Fällen übersteigt.

Testsubstanzen, Stammlösungen und Verdünnungsreihen

Für die toxikologische Prüfung von Einzelstoffen und Gemischen wurden nur Substanzen in der höchsten verfügbaren Reinheit und aus einheitlichen Chargen verwendet. Identität, Reinheit und Bezugsquellen sind den Anhängen A1.2, A2.2, A3.5 und A4.4 zu entnehmen. Sie werden im Text mit den dort angegebenen Kürzeln oder standardisierten *Common Names* bezeichnet.

Von allen Testsubstanzen wurden Stammlösungen in Methanol (*pro analysi*, Merck, Darmstadt) oder Acetonitril (*hplc grade*, Riedel de Haen, Seelze) angesetzt und bei -20 °C oder -30 °C gelagert. Für die analytischen Begleituntersuchungen dienten diese als Eichstandards. Zur toxikologischen Prüfung wurde das organische Lösungsmittel unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand entweder in 2%iger NaCl-Lösung (Bakterientest) oder in Kultivationsmedium (Algentest) aufgenommen. Nach 24-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurden die Konzentrationen dieser wäßrigen Stammlösungen analytisch validiert. Die Lagerung erfolgte erforderlichenfalls bei 4 °C über einen Zeitraum von maximal 8 Wochen. Gelagerte Stammlösungen wurden vor jedem Versuch erneut analytisch geprüft.

Für die Einzelstofftestungen wurden aus den wäßrigen Stammlösungen geometrische Verdünnungsreihen hergestellt. Für die Prüfung der Mischungstoxizität wurden zunächst Mischungen der wäßrigen Stammlösungen so hergestellt, daß die Komponenten darin im Verhältnis ihrer EC_{01} oder ihrer EC_{50} -Werte vorlagen, und dann weiter verdünnt (*fixed ratio design*, s. 5.2). Konzentrationsabstufungen wurde in jedem Falle dem (vermuteten) Verlauf der jeweiligen Konzentrations-Wirkungskurve angepaßt (s. 5.4).

Analytische Begleituntersuchungen

Chemisch-analytische Begleituntersuchungen wurden zum Zwecke der Validierung der Nominalkonzentrationen der verwendeten wäßrigen Testsubstanz-Lösungen sowie zur Bestimmung der Stabilität von Testkonzentrationen unter den Bedingungen der verwen-

deten Biotests durchgeführt. Sie erfolgten mittels hochdruckflüssigkeits-chromatographischer Verfahren (HPLC). Verwendete Geräte, Analysenbedingungen und Ergebnisse der Stabilitätsprüfungen sind in Anhang B3 zusammengestellt.

Biologische Stabilitätsprüfungen

In zwei Fällen (Azaserin und Streptomycin) standen keine hinreichenden chemisch-analytischen Nachweisverfahren für die Prüfung der Konzentrations-Stabilität zur Verfügung. Ersatzweise wurden deshalb biologische Stabilitätskontrollen durchgeführt. Dazu wurden Testsubstanz-Lösungen in Kultivationsmedien unter den Temperatur- und Lichtbedingungen des jeweiligen Biotests "gealtert". Anschließend wurde deren Toxizität im Vergleich zu frisch angesetzten Lösungen geprüft. Da sich keine signifikanten Unterschiede ergaben, wurde auf ausreichende Substanzstabilität geschlossen.

6.2.1 Algentest

Testorganismus war die einzellige Grünalge *Scenedesmus vacuolatus*¹ (früher *Chlorella fusca* SHIH. et KRAUSS var. *vacuolata*)², Stamm 211-15 der Algensammlung Pringsheim (Universität Göttingen). Als Toxizitätsparameter diente die Inhibierung der Reproduktion einer synchronisierten Population (Populationswachstum) bei Exposition über die Dauer eines Generationszyklus (24 h). Durch Einsatz der Synchronkultivierungstechnik (Tamiya 1966) wird das Versuchsmaterial weitgehend standardisiert. Gleichzeitig werden die Kultivationsbedingungen auf eine Maximierung der Reproduktionsleistung in unbehandelten Kontrollkulturen ausgelegt. Die Empfindlichkeit eines solchen 24 h Tests im Sinne von EC₅₀-Werten ist prinzipiell mit dem normierten 72 h-Test an *Scenedesmus subspicatus* (DIN/ISO 8692) vergleichbar (Faust et al. 1992, Grimme et al. 1994).

Synchronisation

Die Synchronisation erfolgt durch rhythmischen Licht-Dunkel-Wechsel von 14:10 h und regelmäßiges Verdünnen auf die Anfangszell-dichte (Lorenzen 1964) vor Beginn des nächsten Wachstumszyklus (t_0). Die Zellen wachsen während der 14stündigen Lichtphase, durchlaufen danach mehrere sukzessive Replikations-Teilungsphasen und setzen am Ende des Generationszyklus 2^n Autosporen pro Mutterzelle frei. Die Synchronisation wurde routinemäßig überprüft. Zu diesem Zweck wurde die Zellvolumenverteilung der Autosporenpopulation zu t_0 auf Homogenität analysiert.

Kultivationsbedingungen und Meßtechnik

Die Algen wurden photoautotroph als Flüssigkulturen unter den in Anhang B1 spezifizierten Bedingungen kultiviert. Zur Anzucht großer Mengen von Versuchsmaterial wurden die Kulturen kontinuierlich mit CO₂-angereicherter Luft durchgast. Diese Technik erlaubt eine Animpf-Zell-dichte von 10^6 Zellen/mL. Bei der Toxizitätstestung wurde hingegen Hydrogencarbonat als CO₂-Quelle eingesetzt. Zur Aufrechterhaltung einer hohen Reproduk-

¹ Kessler et al. 1997

² Shihira und Krauss 1965

tionsrate mußten dabei gasdichte Gefäße verwendet und die Anfangszelldichte auf 7.5×10^4 Zellen/mL herabgesetzt werden. Diese Technik gestattet die Prüfung flüchtiger oder schäumender Testsubstanzen (Erweiterung des Substanzspektrums), die Verwendung kleiner Kulturvolumina (Erhöhung der Testkapazität) und vermeidet Probleme des Absetzens von Algenzellen an Gefäßwänden oberhalb des Flüssigkeitspegels, die durch den Begasungsstrom hervorgerufen werden können (Verringerung der Varianz).

Im Unterschied zum Standard 72 h-Algentest erfolgte die Kultivation nicht mit Ammonium, sondern mit Nitrat als Stickstoffquelle. Der Anfangs-pH betrug nicht 8.3 sondern 6.7. Eine vergleichsweise hohe Pufferkapazität begrenzte den durch die Nitratassimilation hervorgerufenen pH-Anstieg während der Testdauer auf maximal 0.2 Einheiten. Sie erlaubte gleichzeitig die Testung schwacher Säuren und Basen ohne spezielle pH-Einstellung, d.h. unter unveränderten osmotischen Bedingungen. Unbehandelte Kontrollkulturen vermehrten sich innerhalb einer Generation durchschnittlich um den Faktor 12, d.h. die einzelnen Mutterzellen setzten entweder 8 oder 16 Autosporen frei.

Bestimmungen der Zellzahl und Prüfungen der Zellvolumenverteilung erfolgten mit Hilfe eines Coulter Counter Model ZB Industrial und eines Coulter Channelyzer C-1000 (Coulter Electronics Ltd, Luton, Beds., UK). Alle meßtechnischen Details sind bei Altenburger et al. (1990) und Grimme et al. (1994) angegeben.

Durchführung des Tests

Eine synchrone Stammkultur wird zu Beginn des Entwicklungszyklus t_0 so mit Nährmedium (Anhang B1) verdünnt, daß die Zelldichte nach Zugabe von Testsubstanz- und Carbonat-Lösung 7.5×10^4 Zellen/mL beträgt. Die in Nährmedium gelöste Testsubstanz wird in die Testgefäße gegeben und die Algensuspension hinzugefügt. Das Endvolumen betrug 15 mL, der Anteil der Testsubstanzlösung in der Regel 10 %. Bei unzureichender Löslichkeit der Testsubstanz wurden in einzelnen Fällen andere Verhältnisse gewählt. Nach Zugabe von 150 μ L einer 0.15 molaren NaHCO_3 -Lösung werden die Gefäße verschlossen und unter Kultivationsbedingungen inkubiert. Nach 24 h wird die Zellzahl (CN) bestimmt und der pH-Wert kontrolliert. Maximal 90 Testansätze konnten parallel geprüft werden.

Bestimmung des Toxizitätsparameters

Aus den Meßwerten wird die Differenz der Zellzahl (ΔCN) zwischen dem Wirkungsendpunkt t_{24} und dem Anfangswert t_0 ($\Delta \text{CN} = \text{CN } t_{24} - \text{CN } t_0$) berechnet. Durch Normalisierung auf die Vermehrungsdaten in Kontrollkulturen ergeben sich daraus Hemmwerte:

$$(1 - \Delta \text{CN}_{\text{Probe}} / \Delta \text{CN}_{\text{Kontrolle}}) \times 100 = \text{Hemmung der Algenreproduktion in \%}$$

6.2.2 Leuchtbakterientest

Testorganismus war das Leuchtbakterium *Vibrio fischeri* (früher *Photobacterium phosphoreum*), Stamm NRRLB-11177. Als Toxizitätsparameter diente die Inhibierung der Biolumineszenz. Verwendet wurde eine Kurzzeit- und eine Langzeit-Variante dieses Biotests (s. 5.1): der sog. akute Leuchtbakterientest nach DIN 38412, Teil 34 für das Gemisch *ähnlich* wirkender Stoffe (Inkubationszeit 30 min) und der sog. chronische Leuchtbakterientest (Inkubationszeit 24 h) für das Gemisch *unähnlich* wirkender Stoffe¹.

Durchführung

Test-Kits für beide Test-Varianten wurden von der Firma Dr. Lange, Düsseldorf bezogen und bei -20 °C gelagert. Sie wurden ohne Modifizierung verwendet. Die flüssiggetrockneten Bakterien werden durch Zugabe einer mitgelieferten Rekonstitutionslösung reaktiviert, in Einweg-Glasküvetten aliquotiert und mit dem Testgut versetzt, welches sich in einer 2%igen NaCl-Lösung befindet (pH 7.0 ± 0.2). Im Kurzzeit-Test wurden dabei 100 µL Bakteriensuspension und 500 µL Testsubstanzlösung eingesetzt. Im Langzeit-Test waren es jeweils 500 µL. Kontroll-Ansätze wurden entsprechend mit reiner NaCl-Lösung versetzt. Die Testansätze wurden im Kurzzeit-Test über 30 min, im Langzeit-Test über 24 h bei 15 °C inkubiert. Dafür standen 3 Thermoblöcke (Dr. Lange GmbH, Düsseldorf) mit insgesamt 90 Schächten für Meßküvetten zur Verfügung. Messungen der Biolumineszenz wurden mit einem Lumistox™-Luminometer (Dr. Lange GmbH, Düsseldorf) durchgeführt.

Bestimmung des Toxizitätsparameters im Kurzzeit-Test

Aus den Meßwerten berechnet sich die relative Hemmung entsprechend ISO/CD 11348 als

$$\% \text{Hemmung} = 100 - \left(100 * \frac{BL(P)_E}{BL(P)_B * \frac{BL(K)_E}{BL(K)_B}} \right) = 100 - \left(100 * \frac{BL(P)_E}{BL(P)_B} * \frac{BL(K)_B}{BL(K)_E} \right)$$

Dabei bezeichnet

- BL(P)_B die Biolumineszenz einer Probe zu Beginn der Testung,
- BL(P)_E die Biolumineszenz der gleichen Probe nach 30 Minuten Inkubationszeit,
- BL(K)_B das arithmetische Mittel aller Biolumineszenz-Kontrollwerte zu Testbeginn,
- BL(K)_E das arithmetische Mittel aller Biolumineszenz-Kontrollwerte nach 30 Minuten.

¹ Als mögliche Alternative zum Langzeit-Biolumineszenz-Hemmtest wurde in der Eingangsphase des Projektes auch ein chronischer Zellvermehrungs-Hemmtest geprüft (Froehner 1997, Backhaus et al. 1997). Gesichtspunkte der Handhabbarkeit und der Einheitlichkeit des Testparameters ließen die Entscheidung allerdings zugunsten des Langzeit-Biolumineszenz-Hemmtests fallen.

Das Verhältnis der Kontrollmittelwerte $BL(K)_E/BL(K)_B$ dient hierbei als proportionaler Korrekturfaktor für den Biolumineszenz-Meßwert der Probe $BL(P)_B$ zu Testbeginn, der sich ergeben würde, wenn die Biolumineszenz dieser Probe als unbehandelte Kontrolle nach 30 Minuten erneut gemessen werden würde. Es zeigte sich allerdings, daß in Abhängigkeit von der chronologischen Reihenfolge der Messungen zu Testbeginn in den Proben ein (nichtlinearer) Trend vorliegt, der nicht mehr exakt nach 30 Minuten Inkubationszeit über einen Proportionalitätsfaktor reproduzierbar ist. Dies ist insofern für die Berechnung der Hemmwerte im Niedrigeffektbereich bedeutungsvoll, als daß sich dann dort Fehleinschätzungen bis zu 10 % Effektunterschied ergaben. Hierfür wurde deswegen eine verbesserte Methode zur Bestimmung eines bezüglich der Daten realistischeren Korrekturfaktors entwickelt, welche im Anhang B2 dargestellt und an einem Beispiel illustriert wird.

Bestimmung des Toxizitätsparameters im Langzeit-Test

Im Langzeit-Test berechnet sich die relative Hemmung der Biolumineszenz wie folgt (Backhaus et al. 1997):

$$\% \text{ Hemmung} = 100 - \left(100 * \frac{BL(P)_E}{BL(K)_E} \right)$$

Dabei bezeichnet $BL(P)_E$ die Biolumineszenz einer behandelten Probe nach 24 h Inkubation und $BL(K)_E$ entsprechend den Wert einer unbehandelten Kontrolle.

6.3 Biometrische Verfahren

Anforderungen

Das biometrische Ziel dieses Forschungsvorhabens bestand in einer validen quantitativen Vorhersage der Mischungstoxizität nach den Konzepten von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG (vgl. Abbildung 3.1) sowie der Bildung von statistischen Beurteilungskriterien, die einen Vergleich von beobachteter zu vorhergesagter Kombinationswirkung ermöglichen.

Um die Vorhersagbarkeit der Toxizität eines Gemisches nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT experimentell zu prüfen (z.B. 50 % Effekt), müssen zwei Bedingungen erfüllt werden:

- Die Konzentrationen der Gemischkomponenten müssen so festgelegt werden, daß die implizit definierte Modellgleichung der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT erfüllt ist, d.h. die Summe aller Quotienten muß den Wert 1 ergeben. Jeder Quotient beinhaltet dabei die Information einer Gemischkomponente, d.h. im Zähler steht die anteilige Konzentration dieser Komponente im Gemisch und im Nenner eine definierte Effektkonzentration der Einzelsubstanz. Damit wird das Mischungsverhältnis zwischen den Gemischkomponenten definiert.
- Die Effektkonzentrationen im Nenner der Quotienten müssen so gewählt werden, daß sie alle den gleichen Effekt erwarten lassen, wenn sie allein auf den Organismus wirken. Dieser Effekt entspricht dann gleichzeitig dem zu erwartenden Kombinationseffekt. Somit ist die Kenntnis von denjenigen Konzentrationen aller am Gemisch beteiligten Substanzen erforderlich, die den gleichen Effekt verursachen wie die zu erwartende Kombinationswirkung.

Da Vorhersagen der Toxizität von Gemischen für einen Effektbereich von mindestens 10 % bis 80 % - wenn möglich auch darüber hinaus - angestrebt waren, folgt hieraus die Notwendigkeit, daß die entsprechenden Effektkonzentrationen aller Einzelsubstanzen bekannt sein müssen.

Für die Vorhersage der Toxizität von Gemischen nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG ist dagegen die Kenntnis aller Einzelsubstanzeffekte nötig, die sich ergeben würden, wenn die anteiligen Konzentrationen der Substanzen alleine vorliegen. Da die Verrechnung dieser Einzeleffekte zu einem Gesamteffekt nach diesem Konzept immer zu kleineren Vorhersagen führt als die Summe aller Einzeleffekte, ergibt sich unmittelbar hieraus die Folgerung, daß

- die Effekte der anteiligen Konzentrationen der Gemischkomponenten immer kleiner als der zu erwartende Kombinationseffekt sind, und daß
- die Stärke dieser Einzeleffekte mit zunehmender Anzahl von Gemischkomponenten im Verhältnis zum Gesamteffekt dramatisch abnimmt.

Somit ist für die Vorhersage einer Kombinationswirkung bei multiplen Gemischen nach diesem Konzept vor allem die Kenntnis der Konzentrations-Wirkungsbeziehung im Niedrigwirkungsbereich der Einzelsubstanzen erforderlich. Im Zusammenhang mit der Operationalisierung des NOEC über eine 1 %ige Effektkonzentration (EC_{01}) ergibt sich somit als eine notwendige biometrische Bedingung, daß die Effektkonzentrationsbereiche der Gemischkomponenten zwischen EC_{01} und EC_{90} quantitativ beschreibbar sein müssen. Hieraus resultiert die besondere Bedeutung einer validen biometrischen Modellierung der beobachteten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen aller Einzelstoffe (Kapitel 6.3.1), um zu validen Vorhersagen von Mischungstoxizitäten zu gelangen.

Die experimentelle Gemischtestung wurde mit definierten Mischungsverhältnissen durchgeführt, die durch die Effektkonzentrationen der Komponenten festgesetzt sind. Hierdurch ergab sich notwendigerweise ein zeitlicher Ablauf der Experimente: Erst wurden die Toxizitäten der einzelnen Gemischkomponenten bestimmt, um dann auf dieser Grundlage das Mischungsverhältnis festzulegen. Dies erforderte ein hohes Maß an experimenteller Reproduzierbarkeit und mußte in der biometrischen Versuchsplanung berücksichtigt werden.

Statistische Unsicherheit

Erwartungen bzw. Vorhersagen als univariate Schätzwerte entsprechen in der Wahrscheinlichkeitsrechnung immer nur dem Erwartungswert (bzw. Gipfel) einer in der Regel unbekanntem unimodalen Verteilung, d.h. sie sind bei häufiger Wiederholung der mit höchster Wahrscheinlichkeit zu erwartende Ausgang. Ein Beispiel hierfür ist das arithmetische Mittel einer symmetrischen Verteilung. Erwartungswerte können unter Umständen wenig aussagekräftig sein, wenn die Verteilung sehr breit und flach ist und somit der Gipfel sehr unsicher. Einen Eindruck über die Breite einer Verteilung erhält man z.B. über die Varianz oder Konfidenzbereiche. Da die Gesamtfläche unter dieser Verteilung 100 % entspricht, ergibt sich ein 95 %iger zweiseitiger Unsicherheitsbereich (Streuungsintervall, Perzentilbereich, Konfidenzintervall) um den Erwartungswert als diejenigen Schranken, die 2.5 % der rechten und linken Verteilung an den Seiten ausschließen (Perzentile). Im Gegensatz zur Bestimmung des Erwartungswertes sind diese Bereiche Ergebnis von selteneren Beobachtungen und somit unsicherer zu bestimmen, erst recht bei Unkenntnis der zu Grunde liegenden Verteilung.

Grundsätzlich werden zwei unterschiedliche Arten von Verteilungen unterschieden - was bei Nichtstatistikern immer wieder für Verwirrung sorgt - und deshalb am Beispiel einer (unbehandelten) Kontrollpopulation verdeutlicht werden soll: Liegen mehrere normalverteilte Meßdaten vor, so wird über das arithmetische Mittel der Erwartungswert bestimmt. Ist man an der Variabilität (und somit Verteilung) der Kontrollpopulation interessiert und schätzt sie, so führen zusätzliche Daten nur zu präziseren, aber nicht zu kleiner werdenden Streuungsintervallen¹. Soll hingegen die Unsicherheit des geschätzten Erwartungs-

¹ Die Schätzung eines Verteilungsbereiches wird in diesem Zusammenhang als Perzentilschätzung bezeichnet, da die vorgegebenen Schranken (2.5 % bzw. 97.5 % Perzentil) geschätzt werden.

wertes bestimmt werden, so führen zusätzliche Beobachtungen aus dieser Population zu einer sichereren Schätzung des Erwartungswertes, so daß der entsprechende Konfidenzbereich (und somit die Verteilung) in Abhängigkeit von der Beobachtungsanzahl schmaler wird.

Für alle auf experimenteller Basis geschätzten Toxizitätsparameter und somit auch den Vorhersagen einer Mischungstoxizität bedeutet dies, daß deren statistische Unsicherheit (z.B. Konfidenzbereiche) mit zunehmendem experimentellen Aufwand gegen Null strebt.

6.3.1 Konzentrations-Wirkungsanalyse

Soll eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung beschrieben werden, so bedeutet dies immer die vereinfachende Reduktion einer unbekanntenen biologischen Komplexität (vgl. 3.1). Da sich in den verwendeten Biotests die experimentellen Beobachtungen auf die Veränderung einer integralen Meßgröße (Biolumineszenz, Algenreproduktion) in Abhängigkeit von einer Stoffkonzentration reduzieren, wurde die Modellierung dieser gerichteten Beziehung nur auf ein einfaches *Black-Box-Modell* beschränkt. Andere beeinflussende Parameter wurden konstant gehalten und führten zu keiner relevanten, im Modell notwendigerweise zu berücksichtigenden Information. Es wird somit kein funktionaler Zusammenhang beobachtet, sondern ein stochastischer, der über beobachtbare Trends in den Beobachtungsdaten auf das Vorhandensein eines Zusammenhanges schließen läßt und so über eine *Regressionsanalyse* beschrieben werden kann. Die Beobachtungswerte selbst geben nur einen Anhaltspunkt über die Art der Beziehung zwischen der Konzentration und dem Effekt. Im Extremfall können sie sogar eine tatsächlich nicht gegebene Existenz vortäuschen. Es ist jedoch erforderlich, diese Beziehung präzise durch eine formelmäßige Darstellung zu erfassen. Dies erfolgte durch sogenannte *Ausgleichs-* bzw. *Regressionsfunktionen*. Die Beobachtungsdaten weichen von der Ausgleichskurve ab, sie streuen um diese Kurve. Das Ziel dieses Regressionsmodells muß darin bestehen, die beobachtete Konzentrations-Wirkungsbeziehung möglichst gut zu beschreiben und so Aussagen über die Wirksamkeit von solchen Konzentrationen treffen zu können, für die selber keine experimentellen Daten vorliegen.

Modelleinschränkungen

Für mögliche Regressionsmodelle zur Beschreibung einer Konzentrations-Wirkungsbeziehung wurden vorab folgende Restriktionen getroffen:

- Biologische Wirkungsschwellen wurden in der Modellbildung ausgeschlossen.
- Der Definitionsbereich der relativen Effekte liegt zwischen 0 und 1 (bzw. 0 % und 100 %), d.h. diese Schranken als Asymptoten minimalen und maximalen Effektniveaus sind im Modell immer definiert und müssen über zusätzliche Modellparameter nicht beschrieben werden.
- Es liegt immer ein streng monotoner, sigmoider Modellverlauf vor, d.h. zunehmende Konzentrationen führen zu höheren Effekten.

- Fördereffekte im niedrigen Konzentrationsbereich (positive Hemmung bzw. Hormesis) wurden ausgeschlossen und somit nicht modelliert. Sie sind für die Kalkulation von Mischungstoxizitäten nicht notwendig (KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT) oder entsprechen nicht den Voraussetzungen des Konzepts (UNABHÄNGIGE WIRKUNG¹).

Regressionsmodell

Da nichtparametrische Modellklassen (Spline-Funktionen, polynomiale Interpolation etc.) als reine Interpolationsverfahren nur den beobachteten Datenbereich beschreiben, viele Datenpunkte für eine valide Schätzung benötigen und bei nicht monotoner Datenlage durchaus zu nicht eindeutigen Effektkonzentrationschätzungen führen können, schied man sie als mögliche Modelle aus. Deswegen wurden in diesem Vorhaben ausschließlich parametrische, nichtlineare Regressionsmodelle für die Beschreibung von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen gewählt.

Die in der aquatischen Ökotoxikologie gebräuchlichen Standardmodelle (Probit-, Logit- oder Weibull-Modell) wurden von vorne herein als nicht ausreichend flexibel genug angesehen, um den niedrigen Effektbereich jeder getesteten Substanz valide zu beschreiben. Aus diesen Gründen wurden weitere Modelle eingesetzt. Dabei wurde aus numerischen Gründen (Konvergenz im Schätzprozeß, Eindeutigkeit der Lösungen, Bestimmung passender Startwerte der Modellparameter im Iterationsverfahren) die Anzahl der Modellparameter auf maximal 3 begrenzt. Weiterhin sollte das Modell so flexibel sein, daß sowohl ein symmetrischer als auch ein unsymmetrischer Kurvenverlauf beschrieben werden kann. Da der Grad der Flexibilität einer Modellanpassung nur über maximal 3 Modellparameter gesteuert wird, ist es a priori unwahrscheinlich, daß hierdurch jede beobachtete Konzentrations-Wirkungsbeziehung beschrieben werden kann. Deshalb wurden mehrere Regressionsmodelle aus unterschiedlichen Anwendungsbereichen auf ihre Eignung getestet. In Abbildung 6.1 sind die für dieses Vorhaben verwendeten Regressionsmodelle angegeben und im Anhang C1 ausführlich beschrieben.

Bei jeder biometrischen Modellierung einer Konzentrations-Wirkungsbeziehung (einer Einzelsubstanz oder eines Gemisches) wurden im ersten Schritt grundsätzlich unabhängig voneinander alle 10 Regressionsmodelle an die Beobachtungsdaten angepaßt.

In Abbildung 6.2 ist die Bedeutung einer validen Modellwahl am Beispiel einer EC_{01} -Schätzung dargestellt: Wird als Standardmodell das Probit-Modell gewählt, so wird der niedrige und obere Effektbereich offensichtlich falsch geschätzt: Die von diesem Regressionsmodell geschätzte EC_{01} -Konzentration führt im erwartungstreuen *Generalisierten Logit-Modell* zur Schätzung eines Effektes von 8 %. Diese Fehlschätzung des Probit-Modells würde in der Berechnung einer Kombinationswirkung nach dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG unmittelbar zu einer ca. 8 %igen Unterschätzung der Mischungstoxizität führen.

¹ Bliss (1939) formuliert Effekte grundsätzlich als Wahrscheinlichkeiten, welche per Definition immer positiv sind.

Auf Basis von statistischen Beurteilungskriterien wurde entschieden, welches Modell die Beobachtungsdaten am plausibelsten beschreibt und deshalb für die Kalkulation der Vorhersage einer Mischungstoxizität nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT oder UNABHÄNGIGE WIRKUNG verwendet wurde.

Schätzverfahren

Um ein Regressionsmodell den Beobachtungsdaten anzupassen, werden die unbekannt Werte der Modellparameter über statistische Schätzverfahren bestimmt. Die gängigsten Verfahren sind die Methoden der kleinsten Abweichungsquadrate (Minimale-Quadrate-Schätzung), der absoluten Residuen (*Least absolute value estimation*) oder der Maximierung der Likelihood (Maximum-Likelihood-Schätzung). Alle Verfahren beruhen auf unterschiedlichen Voraussetzungen und können zu unterschiedlichen Resultaten kommen. Es existiert in der Regel keine allgemeine Überlegenheit eines dieser Verfahren.

Ausgangspunkt für die Bestimmung eines geeigneten Schätzalgorithmus war die Methode der kleinsten Abweichungsquadrate: Eine notwendige Bedingung für ihre Anwendung besteht darin, daß die Abweichung jeder Beobachtung von ihrem geschätzten Erwartungswert - unabhängig (!) von der eingesetzten Substanzkonzentration - identisch normalverteilt ist, und daß das Modell die Konzentrations-Wirkungsbeziehung erwartungstreu beschreibt. Dann resultieren konsistente Schätzungen aus der minimalsten Summe aller möglichen Abweichungsquadrate.

Hemmung der Algenreproduktion

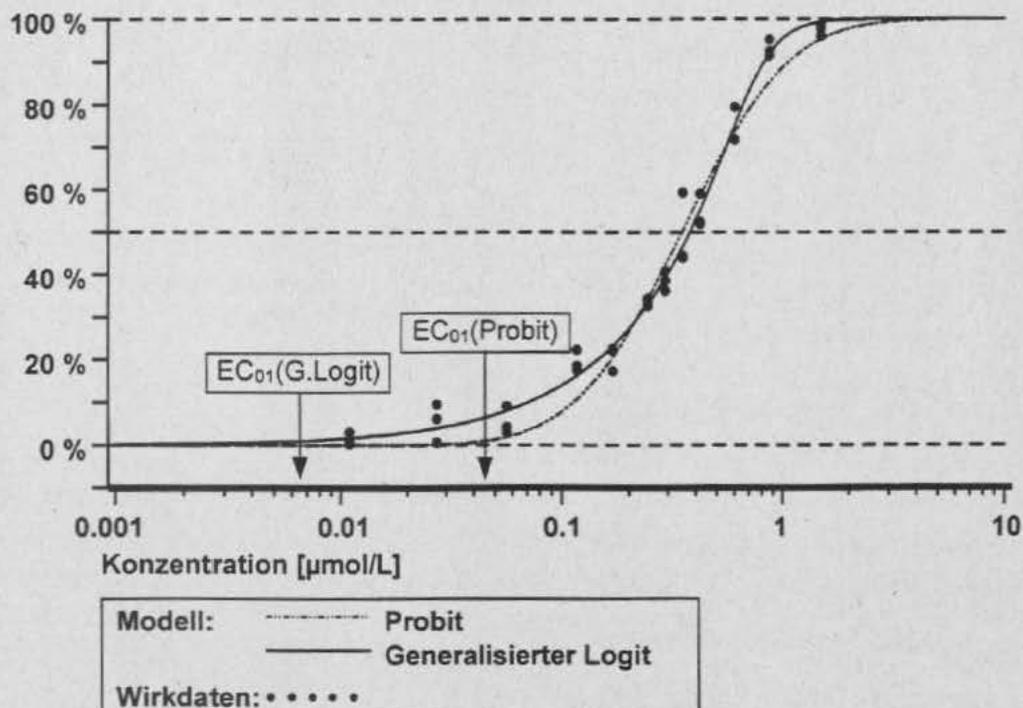


Abb. 6.2: Vergleich der EC_{01} -Schätzungen von zwei Regressionsmodellen (Probit- und Generalisierter Logit) am Beispiel der Algen-Toxizität von Atraton

(vgl. ausführliche Beschreibung der beobachteten Konzentrations-Wirkungsdaten in Anhang D1.1)

Da aber eine Abhängigkeit der Beobachtungsvariabilität vom Effektniveau (Varianzinhomogenität bzw. Heteroskedasizität) vorlag, wurde ein verbesserter Schätzalgorithmus entwickelt. Dieser wird nachfolgend erläutert. Eine ausführliche Beschreibung und Diskussion erfolgt im Anhang C2. Zur Vereinfachung wird immer vorausgesetzt, daß Substanzkonzentrationen keine Zufallsvariablen und somit im Schätzprozess mit keinem statistischen Fehler behaftet sind.

1) Probit:	$\text{Effekt} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\theta_1 + \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})} \exp(-u^2 / 2) du$
2) Logit:	$\text{Effekt} = \frac{1}{(1 + \exp(-\theta_1 - \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})))}$
3) Morgan-Mercier:	$\text{Effekt} = 1 - \frac{1}{1 + (\theta_1 \text{ Konz.})^{\theta_2}}$
4) Weibull:	$\text{Effekt} = 1 - \exp(-\exp(\theta_1 + \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})))$
5) Generalisierter Logit 1*:	$\text{Effekt} = \frac{1}{(1 + \exp(-\theta_1 - \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})))^{\theta_3}}$
6) Generalisierter Logit 2:	$\text{Effekt} = 1 - \frac{1}{(1 + \exp(\theta_1 + \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})))^{\theta_3}}$
7) Aranda-Ordaz:	$\text{Effekt} = 1 - \frac{1}{(1 + \exp(\theta_1 + \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})) / \theta_3)^{\theta_3}}$
8) Logit mit Box-Cox-Transformation:	$\text{Effekt} = \left(1 + \exp\left(-\theta_1 - \theta_2 \frac{\text{Konz.}^{\theta_3} - 1}{\theta_3}\right) \right)^{-1}$
9) Weibull mit Box-Cox-Transformation:	$\text{Effekt} = 1 - \exp\left(-\exp\left(\theta_1 + \theta_2 \frac{\text{Konz.}^{\theta_3} - 1}{\theta_3}\right)\right)$
10) Probit mit Box-Cox-Transformation:	$\text{Effekt} = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{k(\text{Konz.})} \exp(-u^2 / 2) du, \quad k(\text{Konz.}) = \theta_1 + \theta_2 \frac{\text{Konz.}^{\theta_3} - 1}{\theta_3}$ $= \text{Probit}\left(\theta_1 + \theta_2 \frac{\text{Konz.}^{\theta_3} - 1}{\theta_3}\right)$

Anmerkung: θ_1, θ_2 und θ_3 kennzeichnen die zu bestimmenden, unbekanntenen Modellparameter. Nach einer Schätzung werden sie als $\hat{\theta}_1, \hat{\theta}_2, \hat{\theta}_3$ bezeichnet. *Effekt* ist der zu erwartende relative Effekt (definiert zwischen 0 und 1) einer definierten Substanzkonzentration *Konz.*

* Synonym wird nachfolgend der *Generalisierte Logit 1* auch als *Generalisierter Logit* bezeichnet.

Abb. 6.1: Übersicht über die Regressionsmodelle

Bei unterschiedlich normalverteilter Beobachtungsvariabilität bietet sich als alternatives Schätzverfahren die gewichtete Minimale-Quadrate-Schätzung an, welche die Abweichungsquadrate mit unterschiedlichen Gewichtungen versieht: Eine geringere Beobachtungsvariabilität (Replikatenvarianz) resultiert in einer höheren Gewichtung, so daß diese Beobachtungen bei der Schätzung der Modellparameter stärker berücksichtigt werden. Das Problem besteht in der Regel darin, daß die Gewichtungen unbekannt sind und über die beobachtete Dateninformation geschätzt werden müssen. Nur, wie können diese unbekanntes Gewichtungen valide geschätzt werden?

Eine direkte Möglichkeit der Gewichtsschätzung besteht über den reziproken Wert der empirischen Replikatenvarianz, d.h. die an einer definierten Konzentration beobachtete Variabilität in den Effekten. Hohe Varianzen führen so zu kleineren Gewichtungen. Für eine valide Schätzung dieser Replikatenvarianz ist allerdings eine hohe Anzahl von Beobachtungen pro eingesetzter Konzentration erforderlich. In der Regel entspricht dies aber nicht der experimentellen Realität, so daß andere Wege einer sicheren Schätzung gefunden werden müssen. Da davon auszugehen ist, daß Varianzen eng beieinander liegender Effektkonzentrationen ähnlich groß sein sollten, also eine sogenannte unbekanntes, aber reproduzierbare Varianzstruktur vorliegt, besteht eine Alternative gerade in einer Schätzung dieser Struktur. Der Vorteil liegt in der Berücksichtigung aller beobachteten Informationen, so daß bedeutend weniger Replikate (minimal 3) bereits zu validen Schätzungen der Varianz führen können. Ist diese Varianzstruktur beschreibbar, kann sie über ein Modell formalisiert werden. Da als Information nur die eingesetzte Konzentration oder das Effektniveau zur Beschreibung der Varianzstruktur dienen kann, ergibt sich die Frage, ob die Höhe der Varianz eher vom Effektniveau abhängig ist oder von der Konzentration bestimmt wird. In der (biometrischen) Literatur wird im allgemeinen eher von einer Effektabhängigkeit ausgegangen (siehe Carroll und Ruppert 1988), so daß eine (modellhafte) Beschreibung über einen Zusammenhang zwischen einem beliebigen Effektniveau und der dort vorliegenden Variabilität zu bestimmen ist.

Die Form des Zusammenhangs unterschied sich aber zwischen den Testsystemen und den Testsubstanzen stark und war somit nicht generell über ein Modell beschreibbar, so daß die Gewichtsschätzung über unparametrische Glättungsverfahren (gewichtete kubische Splineschätzung, Reinsch 1967) verwendet wurde, wobei für jeden Effekt interpolativ eine Varianz geschätzt wird. Hierbei ergab sich allerdings die Schwierigkeit, daß einerseits durch das Regressionsmodell ein erwarteter Effekt beschrieben werden soll, wofür die Gewichtungen benötigt werden, andererseits gerade dieser Erwartungswert für die Schätzung der Gewichtungen notwendig ist. Einen Ausweg aus diesem Dilemma erhält man über eine Verallgemeinerung der gewichteten Minimale-Quadrate-Schätzung (*generalized least square*). Ausgehend von einer ungewichteten Modellschätzung werden abwechselnd die darauf aufbauenden Gewichtungen bzw. Modellparameter immer wieder erneut geschätzt, so daß jeweils die eine Schätzung als „Vorschätzung“ in den darauffolgenden Schätzprozeß der anderen Komponente einfließt. Dieses Iterationsverfahren konvergiert in der Regel und führt zu validen Schätzungen der Modellparameter und Gewichtungen (Carroll und Ruppert 1988, Hooper 1993).

Um einen eventuellen negativen Einfluß einer vom Datensatz weit entfernt liegenden Beobachtung (*Outlier*) auf die Modellschätzer zu minimieren, wurde als robustes Verfahren die metrische Winsorisierung der Daten (Altenburg 1994a und 1994b, Huber 1981) in den Schätzprozeß implementiert. Dieses Verfahren wird im Anhang C2 in Zusammenhang mit dem Schätzverfahren näher beschrieben.

Die Voraussetzung einer Normalverteilung in den Effektparametern wurde exemplarisch an unterschiedlichen Effektkonzentrationen über 10 Replikate im Algenreproduktionstest überprüft (Testverfahren: Kolmogoroff-Smirnoff-Test). Hieraus ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine grundsätzliche Abweichung, so daß davon ausgegangen werden kann, daß im Sinne des *Zentralen Grenzwertsatzes* (Rényi, 1977) eine Vielzahl von unabhängigen, beliebig verteilten Störgrößen gleicher Größenordnung eine angenähert normalverteilte Zufallsvariable ergeben.

Der gesamte Schätzprozeß für die Regressionsmodelle wurde mit dem Softwareprogramm SAS (SAS 1996) durchgeführt. Die Programmentwicklung erfolgte dabei unter Einbeziehung der SAS-Prozeduren PROC NLIN und PROC IML.

Kriterien der Modellwahl

Da eine Modellerwartung a priori einer Konzentrations-Wirkungsbeziehung nicht eindeutig zugeordnet werden kann, ist es schwierig, an Hand einer Graphik mit den beobachteten Wertepaaren eine Funktion heuristisch auszuwählen. Daher müssen neben einer hinreichend großen Auswahl von möglichen Funktionen numerische Modellwahlkriterien bereitstehen, die die Auswahl einer Regressionsfunktion erleichtern sollen.

Das in der Literatur verbreitetste Kriterium einer Modellselektion ist definiert als die Summe aller quadratischen Residuen (Abweichungsquadrate) und wird in der Regel normiert über die Anzahl der Beobachtungen und Modellparameter. Dieses Verfahren wird standardmäßig angewendet und bezeichnet die Restvarianz als *SSE* oder *ESS* (error sum of squares). Nachteil dieses Kriteriums ist die Empfindlichkeit gegenüber sogenannten *high leverage points* (Beobachtungen, die im Verhältnis zu den restlichen Datenpunkten weit entfernt liegen, aber der Modellerwartung entsprechen) und *Outliern* (seltene Beobachtungen, die von der Erwartung weit entfernt liegen), da dasjenige Regressionsmodell bevorzugt wird, welches den Abstand zwischen diesen Beobachtungen und der Modellschätzung am kleinsten modelliert, obwohl sich dadurch die Modellanpassung der restlichen Beobachtungen geringfügig verschlechtern kann. Deswegen wurde als ein robusteres Auswahlkriterium nicht die normierte Summe der quadratischen Residuen, sondern die der absoluten Beträge der Residuen gewählt (*SAE* bzw. *sum of absolute errors*) (Definition 6.1). In Verbindung mit dem *SAE*-Kriterium wurde darüber hinaus immer begleitend eine Residuenanalyse durchgeführt, um eventuelle systematische Fehleinschätzungen der Erwartungsbildung zu vermeiden.

Definition 6.1: Modellwahl über die normierte Summe der absoluten Residuen (SAE)

$$SAE = \frac{1}{N-p} \sum_{i=1}^N | \text{Effekt beobachtet}_i - \text{Effekt geschätzt}_i |$$

N = Anzahl der Beobachtungen, p = Anzahl der Modellparameter.

Bestimmung von Effektkonzentrationen

Eine Regressionsfunktionen als parametrische Modellbeschreibung einer Konzentrations-Wirkungsbeziehung bestimmt über die Methode der *Verallgemeinerten Minimale-Quadrate-Schätzung* für eine gegebene Konzentration eine mittlere Effektschätzung. Die umgekehrte Beziehung, d.h. die Bestimmung einer Konzentration bei gegebenem Effekt, ist auf Grund der parametrischen Modellierung zu berechnen über

$$\text{Konzentration} = F^{-1}(\text{Effekt}).$$

Hierbei entspricht F^{-1} der inversen Funktion des Regressionsmodells¹ F . Im Gegensatz zur einfachen linearen Regression ist im nichtlinearen Modell eine exakte Bestimmung der dazugehörigen Unsicherheit (Konfidenzbereich) nicht möglich, da die Unsicherheit der Parameterschätzer einfließen muß. Ziel war es deswegen, möglichst „gute“ Abschätzungen für diese Unsicherheit zu gewinnen. Für parametrische Regressionsmodelle existieren drei in der Literatur gängige Approximationsverfahren:

- Konfidenzintervall-Schätzung nach der Fieller-Methode (Finney 1971b, Alho und Valtonen 1995, Cox 1990, Read 1983): Diese Methode ist nur anwendbar für Standardmodelle (Probit, Logit und Weibull) mit einem linearen Term der Modellparameter ($\theta_1 + \theta_2 \times \log_{10}(\text{Konzentration})$) und basiert auf Verteilungseigenschaften des Verhältnisses zweier normalverteilter Zufallsvariablen, als welches sich Effektkonzentrationen über die Parameterschätzer darstellen lassen.
- Konfidenzintervall-Schätzung nach der Delta-Methode (Cox 1990, Bieler und Williams 1993, Halperin und Mantel 1963, Halperin 1964, Oehlert 1992): Sie approximiert die Unsicherheit der Effektschätzung über eine Taylorreihenentwicklung 2. Ordnung und benötigt hierfür die Kovarianzmatrix der Parameterschätzungen. Die Konfidenzintervall-Schätzungen verlieren mit zunehmender Anzahl von Modellparametern und für Niedrig-Effektkonzentrationen ihre Präzision und können zu unrealistischen Werten führen (negative Konzentrationen).
- Likelihood-Ratio basierte Konfidenzintervalle (Cox 1990): Sie sind dann sinnvoll anwendbar, wenn im Schätzprozeß Maximum-Likelihood-Verfahren benutzt werden. Die meisten in diesem Vorhaben verwendeten Modelle sind aber im Zusammenhang mit

¹ In Abbildung 6.1 aller Regressionsmodelle entspricht Effekt gerade $F(\text{Konzentration})$

der Heteroskedasizität in den beobachteten Effekten auf ihre generelle Eignung für dieses Verfahren noch nicht getestet worden.

Alle Verfahren wurden zu Beginn des Vorhabens überprüft und erwiesen sich als nicht geeignet. Um trotzdem eine Abschätzung über diese Unsicherheit zu erhalten, wurden sogenannte Resampling-Verfahren benutzt. Statistische Verfahren basieren auf der Betrachtung von Daten als Ergebnisse eines zufälligen Experiments. Diese Idee macht man sich bei den Resampling-Verfahren zunutze, indem man „künstlich“ einen Zufallsmechanismus einbringt und aus dem vorliegenden Experiment (Stichprobe) wiederholt „neue Stichproben“ zieht. Statt eines beobachteten Datensatzes liegt dann eine Vielzahl von simulierten „Datensätzen“ zu einer Problemdarstellung vor. Diese wiederholte Verwendung eines Teilsatzes eines Originaldatensatzes bildet die Grundlage der Resampling-Verfahren. Sie werden zur nichtparametrischen Schätzung von Fehlermaßen wie etwa der Varianz oder sogar zur Schätzung der gesamten Verteilung und somit von Konfidenzintervallen einer gegebenen Statistik eingesetzt.

Als ein mögliches Resampling-Verfahren eignet sich die Bootstrap-Methode (Efron und Tibshirani 1993, Shao und Tu 1995). Sie wird im Anhang C3 ausführlich erläutert. Notwendige Bedingungen für ihre Anwendung waren die Kenntnis der Beobachtungsvariabilität für jede Konzentration und eine erwartungstreue Modellschätzung.

NOEC-Bestimmung

Für jede Substanz- und Gemischtestung wurde die *No Observed Effect Concentration* (NOEC) und die *Lowest Observed Effect Concentration* (LOEC) über den einseitigen Dunnet-Test (Dunnnett 1955, 1964) bestimmt. Obwohl weitere statistische Testverfahren existieren, wurde diese klassische Testmethode gewählt, da sie in den technischen Richtlinien der Europäischen (European Commission, 1996) als Standardverfahren empfohlen wird. Dieses multiple Testverfahren vergleicht varianzanalytisch einen Kontrollwert gegen Wirkdaten unterschiedlicher Konzentrationen. Voraussetzung sind normalverteilte Daten und Gruppen von Wirkdaten ungefähr gleich starker Besetzung. Als multiples Signifikanzniveau wurde immer 5 % gesetzt.

Grundsätzlich kann dieses Verfahren nur eine LOEC erkennen, deren mittlerer Effekt über der Kontrollvariabilität liegt. Die NOEC resultiert als die nächst kleinere getestete Konzentration. In den Standardverfahren mit festen Verdünnungsreihen entspricht der über ein passendes Regressionsmodell geschätzte Effekt einer NOEC ungefähr 10-30 % (Moore und Caux 1997). Daß die regressionsanalytisch geschätzte EC_{01} wirklich kleiner als die NOEC ist und somit einer gelungenen Operationalisierung entspricht, war somit zu erwarten, aber auch zu prüfen.

Umsetzung

Wurde bei der höchsten getesteten Konzentration lediglich ein Effekt von 80 % beobachtet, dann konnte (Löslichkeit der Testsubstanz vorausgesetzt) ohne Fehleinschätzung bis zum 90 %igen Effekt extrapoliert werden, da in diesem Bereich die beobachtete Variabilität in den Daten relativ gering ist. Dies konnte in vergleichenden Simulationsstudien zu Beginn des Vorhabens bestätigt werden. Somit ergab sich als biometrische Notwendigkeit

für eine Konzentrations-Wirkungsmodellierung, daß Beobachtungen in einem Effektbereich von mindestens 1 % bis 80 % ermittelt werden mußten.

Da im Allgemeinen für die vorliegenden Daten eine erhöhte Variabilität im unteren Effektbereich beobachtet wird und sich somit hier unsichere Schätzungen ergeben, wurden die Einzelsubstanztestungen so geplant, daß ca. 2/3 aller applizierten Substanzkonzentrationen unterhalb der medianen Effektkonzentration (EC_{50}) lagen. Die kleinste getestete Konzentration sollte einen mittleren Effekt kleiner 1 % auslösen, so daß die EC_{01} interpolativ und nicht extrapolativ geschätzt werden konnte.

Die Vergleichbarkeit zwischen den Experimenten wird durch Normalisierung der Daten auf unbehandelte Kontrollen hergestellt (vgl. 6.2). Da aber auch die Kontrollmessungen einer Variabilität unterworfen sind, ist die Bildung eines validen Erwartungswertes für jegliche weitergehende Modellbildung um so wichtiger. Auf Basis von bestehenden Experimenten wurden Qualitätskriterien festgelegt, um eine notwendige Anzahl von Kontrollen zu ermitteln. Um einen 95 %-Konfidenzbereich des Kontroll-Erwartungswertes von maximal ± 5 % zuzulassen (bei gegebener Power von 80 %), wurde die notwendige Anzahl von Kontrollen über Fallzahlkalkulationen festgelegt (Horn und Vollandt 1995). Für den Algenbiotest bedeutete dies bei einer durchschnittlichen Standardabweichung von 5 % mindestens 10 Kontrollen je Experiment und für den Leuchtbakterientest mindestens 7 Kontrollen je Experiment (durchschnittliche Standardabweichung: 3 %).

Als Konsequenz aus dem verwendeten Schätzverfahren ergab sich als zusätzliche biometrische Anforderung an das Experiment, mit mindestens drei Replikaten pro eingesetzter Konzentration zu arbeiten, um so eine Abschätzung der Replikatenvarianz zu ermöglichen.

Da eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der experimentellen Ergebnisse aus den Einzelsubstanztestungen eine absolute Notwendigkeit für die Vorhersagbarkeit der Gemischtoxizität darstellt, wurden die Experimente so gestaltet, daß alle potentiellen externen Störungen berücksichtigt wurden, die in den anschließenden Gemischtestungen eintreten könnten, um eine systematische Fehleinschätzung (Bias) in den Erwartungswerten der Einzelsubstanztoxizitäten zu vermeiden.

6.3.2 Kombinations-Wirkungsanalyse

Kalkulation von Vorhersagen für Mischungstoxizitäten

Die Vorhersagen einer Mischungstoxizität nach den Konzepten KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG entsprechend Abbildung 3.1 werden für definierte Gemischzusammensetzungen über Erwartungswerte gebildet, die aus den Einzelsubstanztestungen geschätzt werden und somit mit unterschiedlichen statistischen Unsicherheiten einhergehen. Folglich ist die Vorhersage einer Mischungstoxizität immer auch ein statistischer Erwartungswert, dessen Güte über einen Unsicherheitsbereich beurteilt werden sollte. Beide Konzepte berücksichtigen keine speziell definierten Interaktionen auf

physiko-chemischer, pharmakologischer oder wirkungsspezifischer Ebene, so daß die Toxizitäten der Einzelsubstanzen als statistisch unabhängig voneinander bzw. unkorreliert interpretiert werden. Es existieren zwar Erweiterungen auf komplexere Modellklassen, die eventuelle Interaktionen über Parametrisierungen berücksichtigen und über Korrelationsquotienten (Plackett und Hewlett 1948, 1952, 1963, Hoel 1987) oder mechanistische Interaktionsterme - beispielsweise spezifische Pharmakon-Rezeptor-Interaktionen - quantifizierbar machen (Greco, Park und Rustum 1990, Greco, Bravo und Parsons 1995, Chou und Talalay 1977, 1981, 1983, 1984). Diese Kombinationswirkungsmodelle beschränken sich aber größtenteils auf binäre Substanzkombinationen. Erweiterungen auf multiple Gemische sind theoretisch diskutiert worden (Ashford 1981, Christensen und Chen 1985, 1991, Chou und Talalay 1981, Hewlett und Plackett 1959), erwiesen sich aber in ihrer Umsetzung als nicht praktikabel¹. Sie wurden somit in diesem Vorhaben nicht berücksichtigt. Im biometrischen Verständnis sind die Toxizitäten der Einzelsubstanzen statistisch unabhängig voneinander und tragen unkorreliert zur Gesamtoxizität bei.

Die Erwartungswerte einer Kombinationswirkung wurden jeweils getrennt für beide Konzepte und für unterschiedliche Konzentrationen bei festem Mischungsverhältnis der Mischungskomponenten berechnet, so daß sich für beide Konzepte Konzentrations-Wirkungskurven ergaben. Die Gemischkonzentrationen wurden so gewählt, daß mindestens Gemischeffekte von 10 % bis 90 % zu erwarten waren. Die generelle Vorgehensweise für die Kalkulation einer beliebigen Gemisch-Effektkonzentration oder eines beliebigen Gemischeffektes wird nachfolgend erläutert, wobei von Fragestellungen ausgegangen wird, wie sie sich zu Beginn des Vorhabens ergaben. Voraussetzung hierfür ist, daß das Mischungsverhältnis zwischen den Gemischkomponenten bekannt und für jede Gesamtkonzentration des Gemisches identisch ist (*fixed ratio*). Andernfalls ist eine eindeutige Bestimmung nicht möglich.

- a) Welche Gesamtkonzentration des Gemisches läßt einen vorgegebenen Effekt X nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT erwarten ?

Seien c_{S_1} bis c_{S_n} die Konzentrationen der Substanzen S_1 bis S_n und EC_x die Konzentration, die einen X %igen Effekt hervorruft. Die Modellgleichung der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT (vgl. 3.1) lautet dann

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_{S_i}}{EC_x(S_i)} = 1 \quad (1)$$

¹ Das Modell der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT kann dahin gehend verallgemeinert werden, daß alle möglichen Interaktionsterme zwischen den Gemischkomponenten integriert und zusätzlich über die Daten geschätzt werden. Das bedeutet für ein Gemisch mit 14 Komponenten, daß insgesamt 91 Interaktionsterme zu bestimmen wären. Darüber hinaus sind auch Interaktionen vorstellbar, die erst in Anwesenheit von 3 (oder mehr) Substanzen eintreten können. Um die geschätzten Interaktionsterme überhaupt als statistisch signifikant erkennen zu können, müßten hierfür sehr viele Daten experimentell erhoben werden (>1000), was bei weitem jeglichen realisierbaren Aufwand überschreitet. Werden die Einzeleffekte als statistisch korreliert angenommen, so bedeutet dies für die Verallgemeinerung des Modells der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG (*Joint Independent Action*, Hewlett und Plackett 1959), daß auf Grundlage einer multidimensionalen Anpassungs-Verteilung eine Korrelationsmatrix geschätzt werden muß. Aber weder diese Verteilung noch die entsprechende Korrelationsmatrix erwiesen sich als bestimmbar.

Die in dieser Gleichung implizit¹ definierte Effektkonzentration des Gemisches $EC_X(\text{Gemisch})$ setzt sich aus substanzanteiligen Konzentrationen c_{Si} zusammen. Da diese Effektkonzentration des Gemisches zu bestimmen ist, sind somit auch die anteiligen Konzentrationen c_{Si} zu bestimmen. Allerdings ist der relative Anteil p_i der i -ten Gemischkomponente von der Gesamtkonzentration immer bekannt, so daß für die substanzanteilige Konzentration c_{Si} in der Gleichung (1) gilt:

$$c_{Si} = p_i * EC_X(\text{Gemisch}) \quad (2)$$

Wird dies in Gleichung (1) eingesetzt, so ergibt sich

$$\sum_{i=1}^n \frac{p_i * EC_X(\text{Gemisch})}{EC_X(S_i)} = 1$$

$$\Leftrightarrow EC_X(\text{Gemisch}) * \sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_X(S_i)} = 1$$

$$\Leftrightarrow EC_X(\text{Gemisch}) = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_X(S_i)} \right)^{-1} \quad (3)$$

Somit kann über Gleichung (3) für jeden beliebigen Gemischeffekt X die entsprechende Effektkonzentration $EC_X(\text{Gemisch})$ des Gemisches berechnet werden, solange die relativen Anteile (p_i) und die Effektkonzentrationen ($EC_X(S_i)$) der Gemischkomponenten bekannt sind. Die Konzentrations-Wirkungskurven der erwarteten Kombinationswirkung nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT wurden so berechnet.

- b) Welcher Effekt X des Gemisches ist nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT zu erwarten, wenn die Gesamtkonzentration des Gemisches bekannt ist ?

Ist die Gesamtkonzentration des Gemisches bekannt, und wird deren Effekt nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT gesucht, so kann die Gleichung (1) über numerische Verfahren gelöst werden (Newtonsche Iterationsverfahren für einfache Nullstellen, Faddejew und Fadejewa 1973). Diese Berechnung war für die Gesamtkonzentration des Gemisches erforderlich, bei der die Gemischkomponenten alle in ihren EC_{01} -Werten vorliegen. Für die Bestimmung des implizit definierten Gemischeffektes reicht es hierbei generell nicht aus, die Konzentrationen aller Gemischkomponenten nur eines Effektniveaus zu kennen.

- c) Welcher Effekt X des Gemisches ist nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG zu erwarten, wenn die Gesamtkonzentration des Gemisches bekannt ist ?

Für die Berechnung eines Gemischeffektes nach dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG sind primär die Effekte einzeln applizierter Mischungskomponenten erforder-

¹ Implizit definiert meint hierbei, daß die zu bestimmende Effektkonzentration des Gemisches nicht direkt in der Gleichung vorkommt, sondern daß auf sie nur indirekt geschlossen werden kann.

lich. Da diese in der Regel unbekannt sind, werden sie aus den Konzentrations-Wirkungsmodellen der im Gemisch vorliegenden Einzelsubstanzen geschätzt. Sei eine beliebige Gesamtkonzentration c_{Gemisch} des Gemisches zusammengesetzt aus definierten Konzentrationen der Gemischkomponenten (c_{Si}) als gegeben

$$c_{\text{Gemisch}} = \sum_{i=1}^n c_{Si} \quad (4)$$

und sei F_i das Regressionsmodell der i -ten Substanz, das für eine beliebige Konzentration c_{Si} einen erwarteten Einzelstoffeffekt $E(c_{Si})$ eindeutig schätzt. Die Vorhersage des entsprechenden, eindeutigen Gemischeffektes $E(c_{\text{Gemisch}})$ nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG (vgl. 3.1) lautet dann

$$\begin{aligned} E(c_{\text{Gemisch}}) &= 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_{Si})) = 1 - [(1 - E(c_{S1})) * \dots * (1 - E(c_{Sn}))] \\ &= 1 - [(1 - F_1(c_{S1})) * \dots * (1 - F_n(c_{Sn}))]. \end{aligned} \quad (5)$$

Da in den Regressionsmodellen (F_1 bis F_n) nur positive Effekte mit einem maximalen Effekt von 1 berechnet werden können, müssen alle inneren Produkte dieser Gleichung (5) auch positiv und kleiner 1 sein. Somit können nur positive Vorhersagen eines Gemischeffektes gebildet werden, deren Maximum folglich dann den Wert 1 annimmt, wenn alle Einzelkonzentrationen der Gemischkomponenten jeweils einen maximalen Einzeleffekt verursachen. Die Konzentrations-Wirkungskurven der erwarteten Kombinationswirkung nach UNABHÄNGIGEN WIRKUNG wurden immer nach (5) berechnet.

- d) Welche Gesamtkonzentration des Gemisches läßt einen vorgegebenen Effekt X nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG erwarten?

Ähnlich wie in b) existiert in dieser Situation keine explizite Form, nach der sich die Gleichung (5) der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG so umformen läßt, daß die erwartete Effektkonzentration des Gemisches direkt berechenbar wird. Hierfür wurde somit auch das iterative Lösungsverfahren nach *Newton* für einfache Nullstellen verwendet. Diese Berechnungen waren notwendig, um nach beiden Konzepten vorhergesagte Effektkonzentrationen der Gemische miteinander vergleichen zu können.

Die Berechnung der statistischen Unsicherheit für die Vorhersagen der Effekte oder der Effektkonzentrationen multipler Gemische erfolgte analog zur Effektkonzentrationsschätzung der Einzelstoffe über Bootstrapverfahren (vgl. Anhang C3). Die wesentliche Erweiterung bestand darin, daß nicht auf Grundlage einer einzelnen Substanztestung mehrere unabhängige Bootstrap-Daten simuliert wurden, sondern notwendigerweise über alle Gemischkomponenten. Hierbei wurde jeweils für jede Substanztestung ein Bootstrap-Datensatz simuliert, an den das ursprüngliche Konzentrations-Wirkungsmodell neu angepaßt wurde, wodurch hieraus dann die Erwartungswerte (Effekte und Effektkonzentrationen) geschätzt wurden, die für die Berechnung der Mischungstoxizität nach beiden Konzepten erforderlich waren. Die Effekte des Bootstrap-Datensatzes wurden über die geschätzte Verteilung der Beobachtungsvariabilität als normalverteilt „ausgewürfelt“. Auf Grundlage

dieser Erwartungswerte von Einzelsubstanztoxizitäten und eines unveränderten, festen Mischungsverhältnisses wurden so die zu erwartenden Kombinationseffekte für beide (Bootstrap-Replikate) neu gebildet. Diese Vorhersagen sind das Resultat von nicht beobachteten, aber realistischen Ausgängen der Einzelsubstanztestungen und bilden somit weniger wahrscheinliche, aber mögliche Vorhersagewerte. Wird dieser Bootstrapvorgang hinreichend oft wiederholt, so erhält man eine entsprechende Anzahl von simulierten Vorhersagewerten, die zusammen eine Verteilung bilden. Der Verteilungsgipfel (Erwartungswert) entspricht dabei der aus den beobachteten Daten gebildeten Kombinationswirkung und der 95 %-Perzentilbereich dieser Verteilung dem 95 %-Konfidenzbereich der erwarteten Kombinationswirkung. Diese Verteilung wurde über die BC-Methode (Efron und Tibshirani 1993) stabilisiert, so daß ein Minimum von 1000 Bootstrapsimulationen als ausreichend festgelegt werden konnte. Grundvoraussetzung war eine erwartungstreue Konzentrations-Wirkungsmodellierung der Einzelsubstanzen.

Statistische Kriterien für die Zusammensetzung des Gemisches

Da das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT bei niedrigeren Effektkonzentrationen zu deutlich höheren Vorhersagen von Effekten führt als das konkurrierende Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG, wurden die Versuchsplanung auf einen erwarteten 50 %-Effekt der Mischung nach dem Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT abgestimmt und dann im Kombinationsexperiment überprüft. Wird bei einem Gemisch von N Substanzen jeweils substanzanteilig eine Konzentration von $1/N$ des EC_{50} der Einzelsubstanzen gewählt, so wird diese 50 %-Erwartung einer Mischungstoxizität nach dem Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT eingehalten. Es hat sich allerdings über die verbesserten Modellanpassungen bei im unteren Effektbereich weniger steilen Einzelstoffkurven gezeigt, daß diese Konzentrationen zu erwarteten Einzelstoffeffekten führen können, die in einen Effektbereich deutlich über 1 % liegen und somit der NOEC-Operationalisierung durch diese Benchmark widersprechen. Um dieses Mischungsdesign bei gleichem Anspruch beizubehalten, wäre eine Anzahl von über 50 Substanzen erforderlich, damit die Substanz mit dem Kurvenverlauf geringster Steigung in ihrer anteiligen Gemischkonzentration nur einen 1 %igen Einzelstoffeffekt aufweist, und somit das Gemisch nach dem Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT bei Einzelstoffeffekten von ≤ 1 % einen 50 %igen Kombinationseffekt erwarten läßt.

Auf Grundlage von experimentellen Voruntersuchungen im Algenreproduktionstest wurde über mathematische Simulationen eine Mindestanzahl von Gemischkomponenten und ein günstiges Mischungsdesign ermittelt, um einerseits eine hinreichend große, statistische Unterscheidbarkeit zwischen den Vorhersagen der beiden Kombinationswirkungskonzepte zu gewährleisten und somit eine eindeutige Zuordnung der Ergebnisse der experimentellen Gemischttestung zu einer Konzeptvorhersage zu ermöglichen, und andererseits den Anforderungen der NOEC-Operationalisierung zu genügen. Hierbei konnte gezeigt werden, daß eine größtmögliche Diskriminanz dann erreicht wird, wenn alle Substanzen des Gemisches in Konzentrationen eingesetzt werden, die in der Einzelstofftestung zum gleichen erwarteten Niedrigeffekt führen. Maßgeblich hierfür ist die *Steilheit* der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der Gemischkomponenten. So wurde zusätzlich ein Mischungsverhältnis verwendet, das dem Verhältnis der EC_{01} -Konzentrationen der Einzelstoffe entspricht. Simulationsrechnungen zu Beginn des Vorhabens führten zum

Ergebnis, daß dabei ungefähr 15-20 Substanzen ausreichen, damit sich die Effektvorhersagen beider Konzepte um mindestens 20 % für eine Mischkonzentration unterscheiden, in der die Gemischkomponenten genau in ihren EC_{01} -Konzentrationen vorliegen. Die Konzepterwartung nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT liegt dabei im allgemeinen unter 50 %, kann aber in Abhängigkeit von der steilsten Gemischkomponente bis über 80 % betragen.

Vergleich von Beobachtungs- und Vorhersagewerten

Als bewährte Beurteilungskriterien für einen Vergleich von beobachteter und vorhergesagter Mischungstoxizität haben sich in der Literatur sogenannte lokale *Abstandsmaße* erwiesen, die mögliche Unterschiede meßbar machen. Grundsätzlich bieten sich zwei Vorgehensweisen an: Entweder wird für eine definierte Gemischkonzentration der vorhergesagte mit dem beobachteten Effekt verglichen, oder aber es werden die Konzentrationen miteinander verglichen, die den gleichen Effekt verursachen. Letztere Methode entspricht der üblichen Vorgehensweise und bietet eine Fülle von unterschiedlichen Abstandsmaßen (*Additivity Index* bzw. *Magnification Factor* nach Marking 1977 bzw. 1985, *Toxic Unit Summation* nach Sprague 1965, Sprague und Ramsay 1970, *Mixture Toxicity Index* nach Köneman 1980, 1981). Allen Vorgehensweisen ist gemeinsam, daß sie von der Annahme konzentrations-additiver Kombinationswirkung ausgehen und somit auf Basis eines definierten Effektniveaus für das Konzept nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT eine Beurteilungsgrundlage bieten.

Da aber zwei konkurrierende Vorhersagen einer Kombinationswirkung von Interesse sind (UNABHÄNGIGE WIRKUNG vs. KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT), wird ein Maß herangezogen, das gleichermaßen für beide Konzepte anwendbar ist und so eine vergleichende Beurteilung einer Über- bzw. Unterschätzung von Effektkonzentrationen ermöglicht: *Index on Prediction Quality (IPQ)* (Grimme et al. 1994, Altenburger et al. 1996). Um dieses Vergleichsmaß zu berechnen, ist eine bereits erfolgte Konzentrations-Effekt-Analyse der im Gemischexperiment ermittelten Daten erforderlich, da hierfür definierte Effektkonzentrationen benötigt werden.

Soll die für einen beliebigen Effekt X geschätzte Konzentration der beobachteten Mischungstoxizität ($EC_{X,observed}$) mit der vorhergesagten Konzentration ($EC_{X,predicted}$) quantitativ über ein Abstandsmaß verglichen werden, kann dies auf zwei verschiedene Weisen erfolgen. Entweder man betrachtet die absoluten Abstände zwischen den beiden Effektkonzentrationen. Diese Herangehensweise ist allerdings wegen der logarithmischen Skalierung der Konzentrationsachse ungeeignet für eine vergleichende Beurteilung. Oder aber es wird das Verhältnis der Effektkonzentrationen gebildet. Der Vorteil dieser dimensionslosen Darstellung liegt in der Vergleichbarkeit von unterschiedlichen Verhältnissen: Ein Wert von z.B. 2 läßt sich so schnell interpretieren als die doppelte Konzentrationsmenge der Bezugskonzentration, die nötig ist, um denselben Effekt zu erzielen. Wird als Bezugskonzentration die beobachtete Effektkonzentration gewählt ($EC_{X,predicted}/EC_{X,observed}$), so ergeben Verhältniswerte über 1 eine Unterschätzung der Mischungstoxizität durch das gewählte Vorhersagemodell (vgl. a) in Abbildung 6.3), während die

umgekehrte Relation ($EC_{X,observed} / EC_{X,predicted}$) bei Werten über 1 genau die entgegengesetzte Interpretation einer Überschätzung zuläßt (b).

Das Problem dieser Vergleichsmaße besteht darin, daß jeweils bei Verhältnissen kleiner 1 nur ein Zahlenraum von 0 bis 1 zur Verfügung steht. Dies hat zur Folge, daß dann ein verzerrtes Bild von Unter- und Überschätzung entsteht, da nicht direkt vergleichbare Zahlenwerte vorliegen.

Beispiel: Sei eine 10fach höhere Effektkonzentration beobachtet worden als vorhergesagt. Dann ergibt sich nach a) unmittelbar ein Verhältnis von 10. Hat hingegen ein alternatives Vorhersagemodell eine 10fach höhere Konzentration prognostiziert als wirklich beobachtet worden ist, ergibt sich für die gleiche Relation nach a) ein Wert von 0.1.

Eine Vergleichbarkeit zwischen diesen beiden Werten und gleichzeitig eine durchgehende Skala wird mit dem IPQ hergestellt (vgl. Definition 6.2 bzw. c) in Abbildung 6.3). Er ist leicht zu vergegenwärtigen, da je nachdem, ob die vorhergesagte oder die beobachtete Effektkonzentration größer ist, das Verhältnis der Effektkonzentrationen um den Wert 1 korrigiert wird, so daß bei exakter Übereinstimmung der beobachteten mit der vorhergesagten Effektkonzentration immer ein IPQ von 0 vorliegt. In dem bereits erwähnten Beispiel würden sich somit IPQ-Werte von -9 als eine Überschätzung und +9 als eine Unterschätzung der Toxizität über das gewählte Vorhersagemodell gegenüberstehen.

Der IPQ-Index führt somit zu folgenden Bewertungen:

- Vorhersage \approx Beobachtung, dann $IPQ \approx 0$ (Übereinstimmung).
- Vorhersage $>$ Beobachtung, dann $IPQ > 0$ (Unterschätzung der Toxizität).
- Vorhersage $<$ Beobachtung, dann $IPQ < 0$ (Überschätzung der Toxizität).

Das IPQ-Maß wurde grundsätzlich nach jeder Gemischttestung für hinreichend viele definierte Effektniveaus zwischen 10 und 90 % berechnet, um so eine globale Beurteilung zu ermöglichen, und in einer Abbildung zusammenfassend dargestellt. Hierbei wurden IPQ-Berechnungen für beide Konzepte durchgeführt. Die Kalkulation der entsprechenden statistischen Konfidenzbereiche erfolgt analog der vorstehend bereits beschriebenen Methode über Bootstrapverfahren (vgl. Anhang C3) mit der Erweiterung, daß zusätzlich die Gemischttestung in den Simulationsschritt integriert wird (Resample) und so mindestens

Definition 6.2: Index on prediction quality (IPQ)

$$IPQ = \begin{cases} + \frac{EC_{X,predicted}}{EC_{X,observed}} - 1 & \text{für } EC_{X,predicted} \geq EC_{X,observed} \\ - \frac{EC_{X,observed}}{EC_{X,predicted}} + 1 & \text{für } EC_{X,predicted} < EC_{X,observed} \end{cases}$$

$EC_{X,predicted}$: Mischungskonzentration nach Vorhersage, die einen Effekt X hervorruft,

$EC_{X,observed}$: Mischungskonzentration auf Grundlage der Beobachtungsdaten, die einen Effekt X hervorruft.

1000 mögliche IPQ-Maße (Bootstrap-Replikate) gebildet werden, um eine approximative Abschätzung der Unsicherheit zu ermöglichen. Voraussetzung hierfür ist die statistische Unabhängigkeit der Gemischttestung von den Einzelsubstanztestungen.

Anforderungen an die experimentelle Testung

Da die Schätzung der statistischen Unsicherheit der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der Gemische für den Vergleich von Beobachtungs- und Vorhersagewerten notwendig ist, ergaben sich die gleichen biometrischen Anforderungen an das Experiment wie für die Einzelsubstanztestung. Um die Frage zu beantworten, ob Mischungskomponenten in niedrigen, allein nicht signifikanten Konzentrationen (NOEC) zur Mischungstoxizität beitragen, wurde die Gemischkonzentration, bei der die Gemischkomponenten in ihren EC_{01} -Konzentrationen vorliegen, zusätzlich mit mindestens 30 Replikaten getestet, um selbst sehr kleine Kombinationseffekte statistisch abzusichern zu können. Als Testverfahren, unter Berücksichtigung von ungleichen Varianzen, wurde hierfür der modifizierte t-Test nach Cochran und Cox (1950) benutzt.

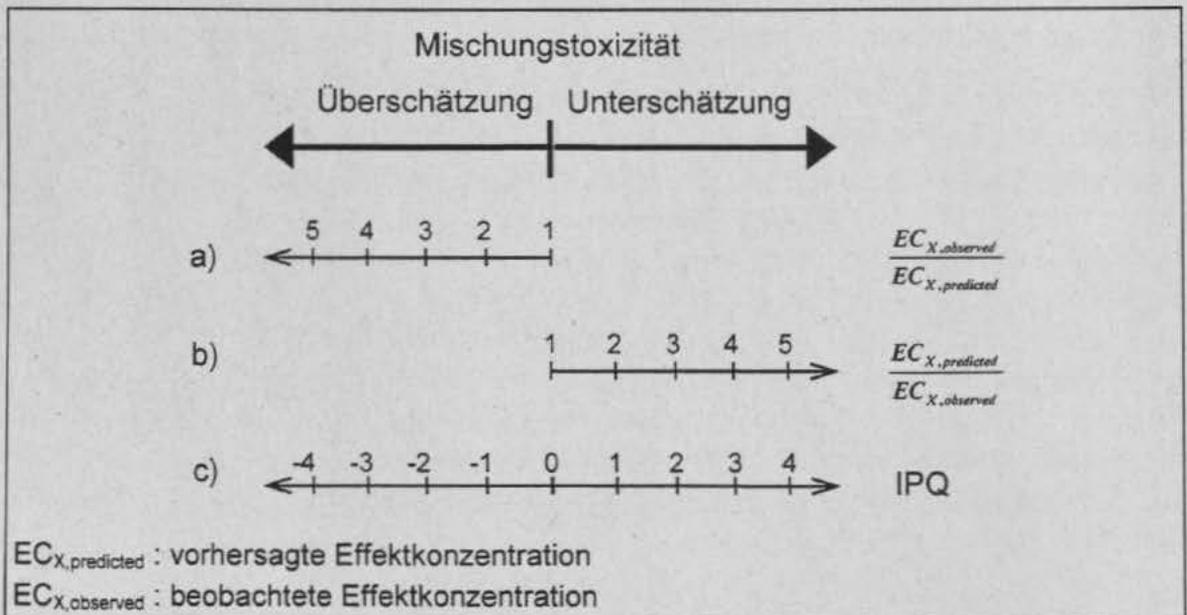


Abb. 6.3: IPQ-Skala für den relativen Abstand zwischen vorhergesagter und beobachteter Effektkonzentration eines Gemisches

7 Mischungstoxizität ähnlich wirkender Stoffe (Referenzgemische)

Die aquatische Toxizität multipler Gemische *ähnlich* wirkender Stoffe kann mit Hilfe des Konzeptes der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT vorhergesagt werden, wenn die Toxizität der Einzelstoffe bekannt ist. Diese Ausgangs-Hypothese wird durch die Ergebnisse der nachfolgend dargestellten Kombinations-Wirkungsanalysen an Algen (7.1) und Leuchtbakterien (7.2) bestätigt, und zwar für jeweils unterschiedliche Stoffgemische und jeweils zwei verschiedene Mischungsverhältnisse der Komponenten. Neu ist dabei, daß die Mischungskomponenten keine sog. *narkotisch* wirkenden Stoffe waren (s. 3.5), sondern jeweils identische spezifische Wirkungsmechanismen aufwiesen. Neu ist auch, daß der experimentelle Nachweis nicht nur auf einem einzigen Effektniveau (z.B. 50 %) geführt wird, sondern den gesamten Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve im Bereich von EC₁₀ bis EC₉₀ einschließt. Neu ist vor allem aber, daß die Validität der Prognosen auch für den Fall belegt werden kann, daß Mischungskomponenten in Konzentrationen vorliegen, die alleine nur geringe, statistisch nicht signifikante Effekte hervorrufen (\leq NOEC). Und neu ist schließlich auch, daß gleichzeitig demonstriert werden kann, daß das konkurrierende Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG für die multiplen Testgemische *ähnlicher* Wirkung einen deutlich schlechteren Prognosewert aufweist. Damit wurde der bisherige Mangel eindeutiger und unzweifelhafter Referenzfälle *konzentrations-additiven* Zusammenwirkens behoben (s. 3.5). Es wurde ein klarer Bezugspunkt für die vergleichende Analyse der Mischungstoxizität von Stoffen *unähnlicher* Wirkung geschaffen.

7.1 Ähnliche Wirkung im Algentest

Zusammensetzung der Testgemische

Die Testgemische bestanden aus 18 congenen s-Triazinen (Tab. 7.1). Alle diese Stoffe interagieren spezifisch mit der sog. *herbicide binding niche* des D1-Proteins im Photosystem II und inhibieren dadurch den photosynthetischen Elektronentransport. Dies gilt nach vier Jahrzehnten intensiver wirkungsmechanistischer Forschung als gesicherter Stand des Lehrbuchwissens (s. z.B. Hock, Fedtke, Schmidt 1995). In einem Test mit Grünalgen repräsentiert dieses Testgemisch deshalb den Fall *ähnlicher* Wirkung in geradezu idealtypischer Weise (vergl. 3.4).

Alle 18 Testsubstanzen sind als Wirkstoffe von Herbiziden entwickelt worden. 12 werden aktuell noch für diesen Zweck kommerziell genutzt. Als Folge des weitverbreiteten Einsatzes, einer relativ guten Wasserlöslichkeit und einer vergleichsweise hohen Persistenz werden insbesondere Atrazin (s. Huber 1993, Solomon et al. 1996), aber auch andere s-Triazine und ihre Abbauprodukte als Kontaminantien europäischer und nordamerikanischer Oberflächengewässer nachgewiesen. Für 8 der 18 Testsubstanzen liegen Positivbefunde aus Monitoring-Programmen für deutsche Gewässer vor (s. Anhang A1.1).

Tab. 7.1: Zusammensetzung des Referenzgemisches *ähnlich* wirkender Stoffe im Algentest (18 s-Triazine)

Substanz	Struktur		
	R1	R2	R3

Chlor-s-Triazine

Atrazin	Cl	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH ₂ CH ₃
Cyanazin	Cl	NHCH ₂ CH ₃	NHCCN(CH ₃) ₂
Propazin	Cl	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH(CH ₃) ₂
Sebuthylazin	Cl	NHCH ₂ CH ₃	
Simazin	Cl	NHCH ₂ CH ₃	NHCH ₂ CH ₃
Terbuthylazin	Cl	NHCH ₂ CH ₃	NHC(CH ₃) ₃

Methoxy-s-Triazine

Atraton	CH ₃ O	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH ₂ CH ₃
Prometon	CH ₃ O	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH(CH ₃) ₂
Sebumeton	CH ₃ O	NHCH ₂ CH ₃	
Terbumeton	CH ₃ O	NHCH ₂ CH ₃	NHC(CH ₃) ₃

Methylthio-s-Triazine

Ametryn	CH ₃ S	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH ₂ CH ₃
Desmetryn	CH ₃ S	NHCH ₃	NHCH(CH ₃) ₂
Dimethametryn	CH ₃ S		NHCH ₂ CH ₃
Dipropetryn	CH ₃ S	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH(CH ₃) ₂
Methopropyryn	CH ₃ S	NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OCH ₃	NHCH(CH ₃) ₂
Prometryn	CH ₃ S	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH(CH ₃) ₂
Simetryn	CH ₃ S	NHCH ₂ CH ₃	NHCH ₂ CH ₃
Terbutryn	CH ₃ S	NHCH ₂ CH ₃	NHC(CH ₃) ₃

Wegen der spezifischen Wirkung auf die Photosynthese sind Grünalgen und andere Primärproduzenten gegenüber dieser Substanzgruppe die empfindlichsten Glieder der aquatischen Nahrungskette. Tiere und heterotrophe Einzeller tolerieren um Größenordnungen höhere Konzentrationen (s. Huber 1993). Die durchgeführten Kombinations-Wirkungsanalysen gewinnen somit nicht nur als theoretisch interessanter Referenzfall Bedeutung, sondern sind auch für die Beurteilung real existierender Belastungssituationen von unmittelbarer Relevanz.

Toxizität der Einzelstoffe

Für jede der 18 Einzelsubstanzen wurde eine Konzentrations-Wirkungsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen des Anhangs D1.1 dokumentiert. Zusammenfassend sind in Tab. 7.2 die Konzentrations-Wirkungsfunktionen aufgelistet, die die Versuchsdaten jeweils bestmöglich beschreiben. In Abb. 7.1 sind die Graphen dieser Funktionen visualisiert. Zusätzlich sind in Tab. 7.2 wichtige toxikologische Kenngrößen angegeben, die die Lage und die Steilheit dieser Kurven sowie den Bereich nicht signifikanter Effekte markieren.

Mit einer EC_{50} von nur 16 nmol/L (3.6 μ g/L) weist Ametryn in dieser Substanzreihe die höchste Algentoxizität auf. Um mit Prometon, der schwächst wirksamen Komponente, den gleichen Effekt hervorzurufen, muß eine etwa 34 mal höhere Konzentration, nämlich 547 nmol/L (123 μ g/L) eingesetzt werden. Für die statistisch geschätzten EC_{01} -Konzentrationen ergibt sich eine etwa ebenso große Toxizitätsspanne. Sie reicht von 0.7 nmol/L Ametryn (0.16 μ g/L) bis zu 22 nmol/L Prometon (5 μ g/L).

Das Verhältnis zwischen den beiden genannten Effekt-Konzentrationen (EC_{01} / EC_{50}) kennzeichnet die Steigung im unteren Teil der Konzentrations-Wirkungskurve. Es variiert zwischen 0.008 (Propazin) und 0.127 (Dimethametryn). Das bedeutet, daß im einen Extremfall (Propazin) die EC_{50} mehr als 100mal größer ist als die EC_{01} . Im anderen Extremfall (Dimethametryn) kann bereits eine Erhöhung der Konzentration um den Faktor 8 den Effekt von 1 % auf 50 % steigern. Diese Unterschiede in der Steigung haben Konsequenzen für die Analyse des Beitrages niedriger Einzelstoff-Konzentrationen zur Gesamt-Toxizität eines multiplen Gemisches, wie später noch demonstriert wird.

Die aus den Konzentrations-Wirkungsbeziehungen kalkulierten EC_{01} -Werte (*Benchmarks*) sollten als Operationalisierung der üblicherweise varianz-analytisch bestimmten NOEC-Werte verwendet werden (s. 3.3, 5.6 und 6.3.1). Dies führt zu der Frage, ob die EC_{01} -Werte tatsächlich kleiner sind als die NOEC-Werte? Tabelle 7.2 weist aus, daß diese Situation bei jeder der 18 Mischungskomponenten gegeben ist. Die NOEC ist mindestens um den Faktor 1.7 (Terbutylazin), im Extremfall (Atrazin) sogar um mehr als das 20igfache größer als die EC_{01} .

Tab. 7.2: Algentoxizität der 18 Einzelstoffe des Referenzgemisches *ähnlicher* Wirkung (18 s-Triazine)

Substanz	Modell ¹⁾	Modellparameter			Effekt-Konzentrationen		NOEC ³⁾ ($\mu\text{mol/L}$)	$\frac{EC_{01}}{EC_{50}}$	$\frac{NOEC}{EC_{01}}$
		$\hat{\theta}_1$	$\hat{\theta}_2$	$\hat{\theta}_3$	EC_{01} ($\mu\text{mol/L}$) ²⁾	EC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) ²⁾			
Ametryn	Gen.Logit I	13.648	8.63	0.340	0.0007 [0.0003-0.0013]	0.016 [0.015-0.016]	0.0021	0.045	3.0
Atraton	Gen.Logit I	1.30	11.06	0.204	0.0069 [0.0040-0.0999]	0.378 [0.330-0.395]	0.0565	0.018	8.2
Atrazin	Gen.Logit I	6.76	17.39	0.112	0.0017 [0.0008-0.0032]	0.180 [0.168-0.193]	0.0364	0.010	20.9
Cyanazin	Box-Cox-Probit	8.64	7.40	0.648	0.0069 [<0.001 -0.0269]	0.113 [0.108-0.119]	0.0208	0.061	3.0
Desmetryn	Weibull	5.36	3.99		0.0032 [0.0026-0.0039]	0.037 [0.036-0.038]	0.0071	0.087	2.2
Dimethametryn	Weibull	5.72	4.73		0.0066 [0.0049-0.0086]	0.052 [0.049-0.054]	0.0182	0.127	2.8
Dipropetryn	Box-Cox-Weibull	5.64	3.03	0.200	0.0036 [0.0001-0.0082]	0.080 [0.077-0.083]	0.0180	0.044	5.0
Methoprotryn	Gen.Logit I	31.19	32.44	0.107	0.0052 [0.0041-0.0069]	0.069 [0.067-0.071]	0.0177	0.075	3.4
Prometon	Weibull	0.43	3.04		0.0221 [0.0132-0.0346]	0.547 [0.493-0.600]	0.1542	0.040	7.0
Prometryn	Gen.Logit I	256.97	251.11	0.011	0.0017 [0.0012-0.0023]	0.052 [0.050-0.054]	0.0034	0.033	2.0
Propazin	Gen.Logit I	1.95	14.44	0.128	0.0024 [0.0009-0.1024]	0.310 [0.262-0.337]	0.0283	0.008	11.9
Sebuthylazin	Weibull	2.76	3.56		0.0086 [0.0060-0.0117]	0.133 [0.124-0.142]	0.0332	0.065	3.8
Secbumeton	Gen.Logit I	5.85	14.15	0.135	0.0015 [0.0007-0.0030]	0.168 [0.152-0.183]	0.0118	0.009	7.7
Simazin	Weibull	0.83	2.18		0.0032 [0.0024-0.0043]	0.282 [0.271-0.294]	0.0185	0.011	5.8
Simetryn	Weibull	3.63	3.03		0.0019 [0.0015-0.0024]	0.048 [0.046-0.050]	0.0042	0.040	2.2
Terbumeton	Weibull	2.62	3.03		0.0041 [0.0024-0.0069]	0.103 [0.092-0.115]	0.0111	0.040	2.7
Terbuthylazin	Weibull	4.16	3.91		0.0057 [0.0044-0.0073]	0.069 [0.066-0.073]	0.0097	0.083	1.7
Terbutryn	Gen.Logit I	26.28	20.00	0.195	0.0032 [0.0024-0.0044]	0.032 [0.031-0.034]	0.0066	0.099	2.1

¹⁾ Siehe Abb. 6.1²⁾ In Klammern sind die unteren und oberen Grenzen des 95 % Konfidenzintervalles angegeben³⁾ DUNNET-Test, siehe Kapitel 6.3.1

Es ist davon auszugehen, daß die in einem 24 h-Test mit Synchronkulturen von *Scenedesmus vacuolatus* bestimmten Toxizitätswerte von s-Triazinen in etwa auf den normierten 72 h-Algentest mit *Batch*-Kulturen von *Scenedesmus subspicatus* übertragbar sind. Dies kann am Beispiel von Atrazin demonstriert werden. Der EC_{50} -Wert im 72 h-Standardtest wird mit $43 \mu\text{g/L}$ angegeben (Huber 1993). Der in diesem Projekt ermittelte Wert von $39 \mu\text{g/L}$ ($0.18 \mu\text{mol/L}$) stimmt damit sehr gut überein. Die NOEC wird von niederländischen Behörden mit 1.5 bis $15 \mu\text{g/L}$ beziffert (Canton et al. 1991). Auch diese Angabe deckt sich mit dem von uns bestimmten Wert von rund $8 \mu\text{g/L}$ ($0.0036 \mu\text{mol/L}$).

Toxizität der Gemische

Konzentrations-Wirkungsanalysen wurden für Testgemische durchgeführt, die sämtliche 18 s-Triazine gleichzeitig enthielten, und zwar zum einen im Verhältnis ihrer EC_{50} -Werte und zum anderen im Verhältnis ihrer EC_{01} -Werte¹. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen des Anhangs D2.1 dokumentiert. Als EC_{50} -Werte ergaben sich 94 nmol/L für das EC_{01} -Gemisch und 145 nmol/L für das EC_{50} -Gemisch. Die EC_{50} -Werte der Gemische liegen damit innerhalb der Toxizitätsspanne, die durch die stärkst und schwächst wirksamen Einzelstoffe markiert wird (s.o.).

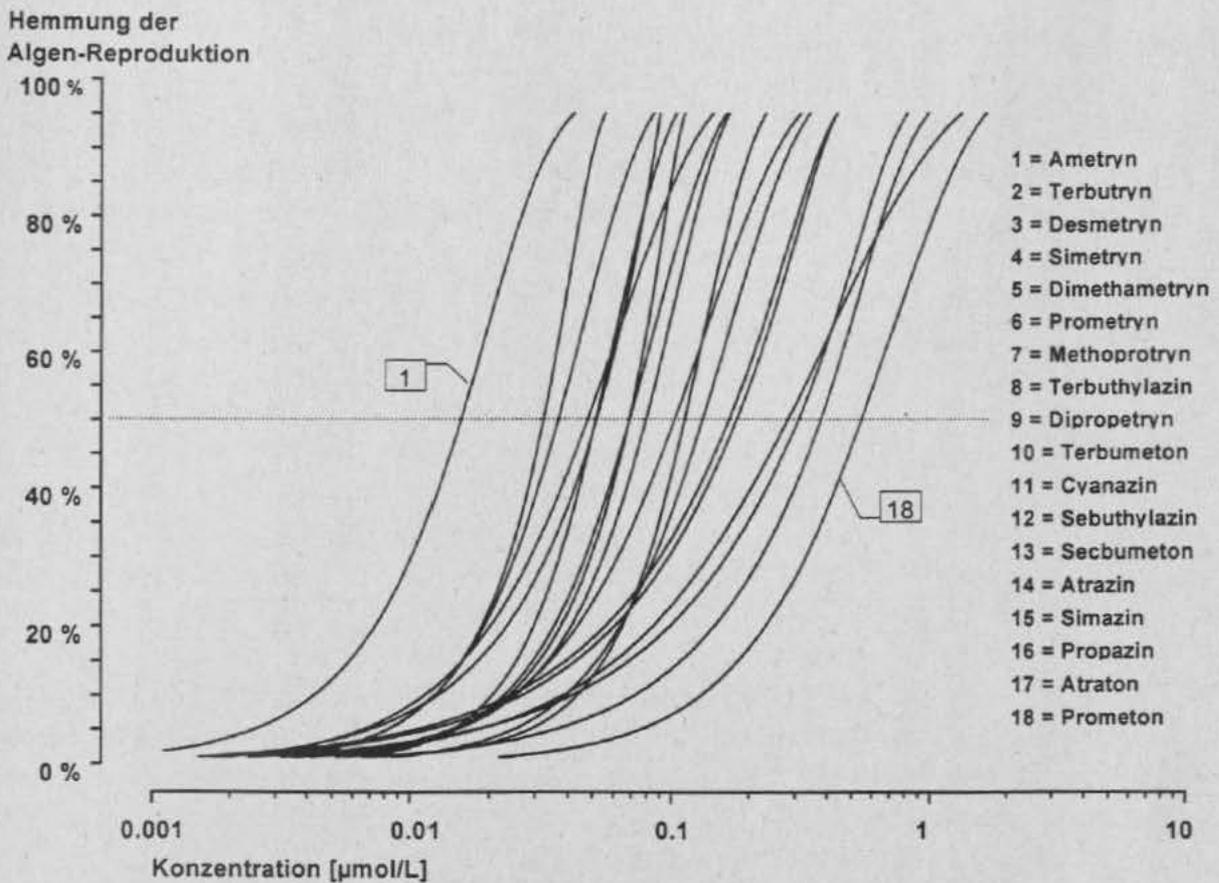


Abb. 7.1: Konzentrations-Wirkungskurven von 18 *ähnlich* wirkenden Substanzen im Algentest (s-Triazine)

Die Substanzen sind in der Reihenfolge ihrer EC_{50} -Werte aufgeführt

¹ Im weiteren kurz als EC_{50} -Gemisch bzw. EC_{01} -Gemisch bezeichnet

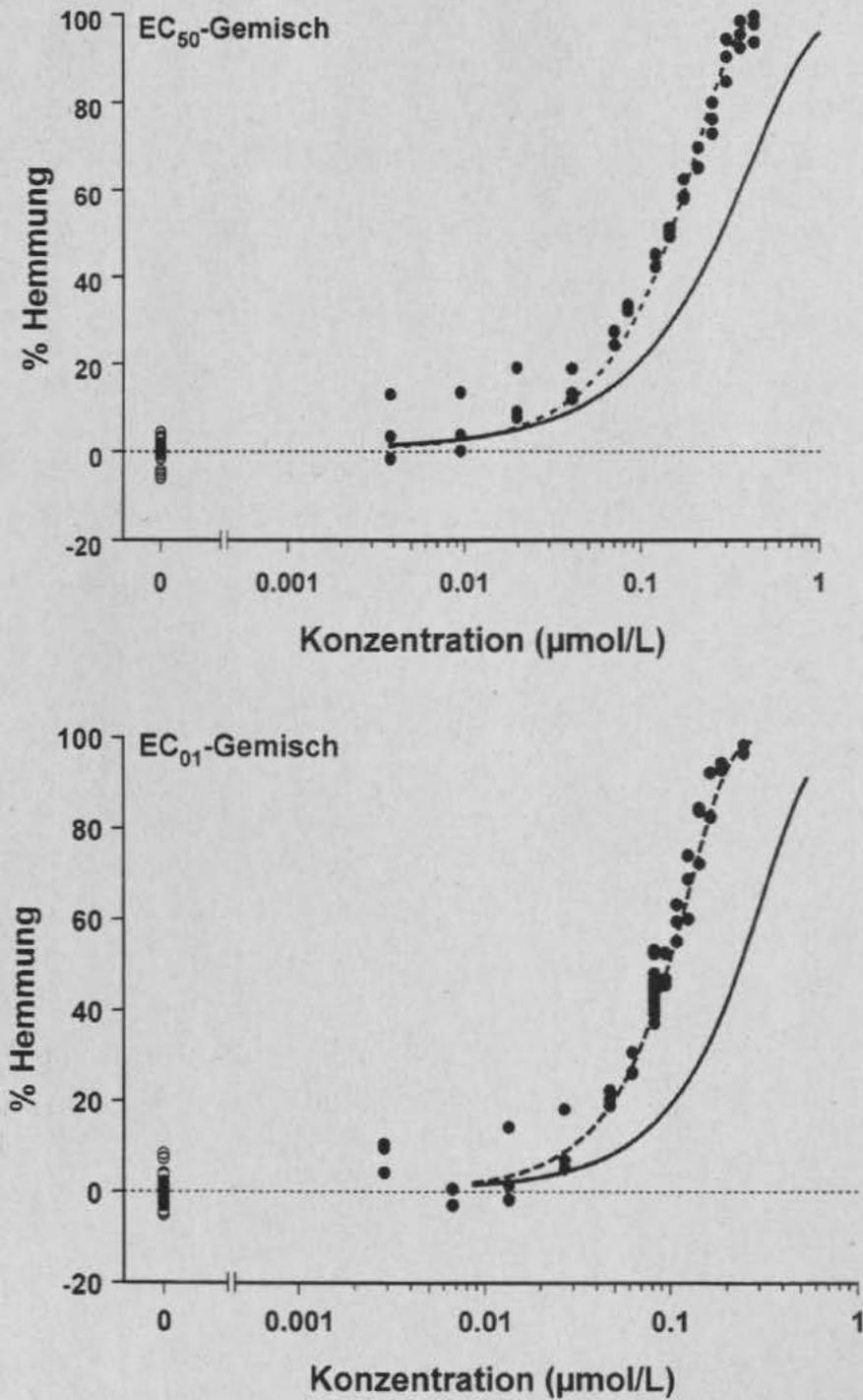


Abb. 7.2: Beobachtete und vorhergesagte Mischungstoxizitäten *ähnlich* wirkender Stoffe im Algentest

- Unbehandelte Kontrollen ● Behandelte Proben
- Vorhersage nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT
- Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG

Prüfung der Vorhersagbarkeit

Prognosen der Mischungstoxizität werden punktweise für definierte Effektniveaus kalkuliert (s. 3.2 und 6.3.2). In Schritten von 1 % mit jedem der beiden Vorhersage-Konzepte für jedes der beiden Mischungsverhältnisse durchgeführt, ergeben sich die in Abb. 7.2 dargestellten Vorhersagen des Verlaufs der prognostizierten Konzentrations-Wirkungskurven. Zum Vergleich sind sämtliche für die Gemische experimentell bestimmten Datenpunkte in die Abbildung eingetragen. Unmittelbar erkennt man eine sehr gute Übereinstimmung dieser beobachteten Toxizitätsdaten mit den Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und eine deutliche Fehleinschätzung der Mischungstoxizität durch das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG. Die Übereinstimmung mit der Prognose nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT ist sogar so gut, daß man ohne Erläuterung glauben könnte, es handele sich um eine regressionsanalytisch an die Daten angepaßte Konzentrations-Wirkungskurve und nicht um eine Vorhersage auf der Basis der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der Einzelsubstanzen. UNABHÄNGIGE WIRKUNG läßt durchweg zu hohe Effekt-Konzentrationen prognostizieren, d.h. die Toxizität wird unterschätzt. Das Ausmaß dieser Unterschätzung fällt je nach Effektniveau und Mischungsverhältnis unterschiedlich groß aus.

Genauigkeit der Vorhersagen

Zur quantitativen Analyse der Vorhersage-Genauigkeit werden die Abstände zwischen beobachteter und vorhergesagter Toxizität in *IPQ*-Einheiten ausgedrückt (*Index on Prediction Quality*). Die *IPQ*-Skala ist in 6.3.2 mathematisch definiert worden (s. Definition 6.2). Zur schnellen Orientierung über die Bedeutung der Werte ist die Visualisierung der *IPQ*-Skala in Abb. 6.3 heranzuziehen. *IPQ*-Werte bezeichnen die Genauigkeit, mit der Konzentrationen von Gemischen vorhergesagt werden, die einen bestimmten Effekt hervorrufen. Sie wurden in 1 %-Schritten für den Bereich von 10 % bis 90 % Hemmung kalkuliert, so daß sich die in Abb. 7.3 dargestellten Graphen ergeben. Für ausgewählte Effektniveaus sind sie in Anhang E1 zahlenmäßig dokumentiert.

Die *IPQ*-Werte sind in Abb. 7.3 gegen den beobachteten Effekt des Gemisches aufgetragen. Diese Auftragung erfolgt analog zur Darstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen in Abb. 7.2. Die absolute Konzentrations-Skala ist durch die dimensionslose *IPQ*-Skala ersetzt, während die Effekt-Skala unverändert bleibt. Die Null-Linie markiert den Fall exakter Übereinstimmung zwischen vorhergesagter und beobachteter Mischungstoxizität. Positive *IPQ*-Werte kennzeichnen die Fälle, in denen vorhergesagte Effekt-Konzentrationen größer als die beobachteten sind, die Toxizität also unterschätzt wurde. Negative *IPQ*-Werte quantifizieren umgekehrt das Ausmaß von Überschätzungen. Die abgebildeten Konfidenzintervalle kennzeichnen die statistische Unsicherheit der *IPQ*-Werte und damit die Schärfe oder Unschärfe, mit der die Effekt-Konzentrationen des Testgemisches auf der Basis der Einzelstoff-Toxizitätsdaten vorhergesagt werden.

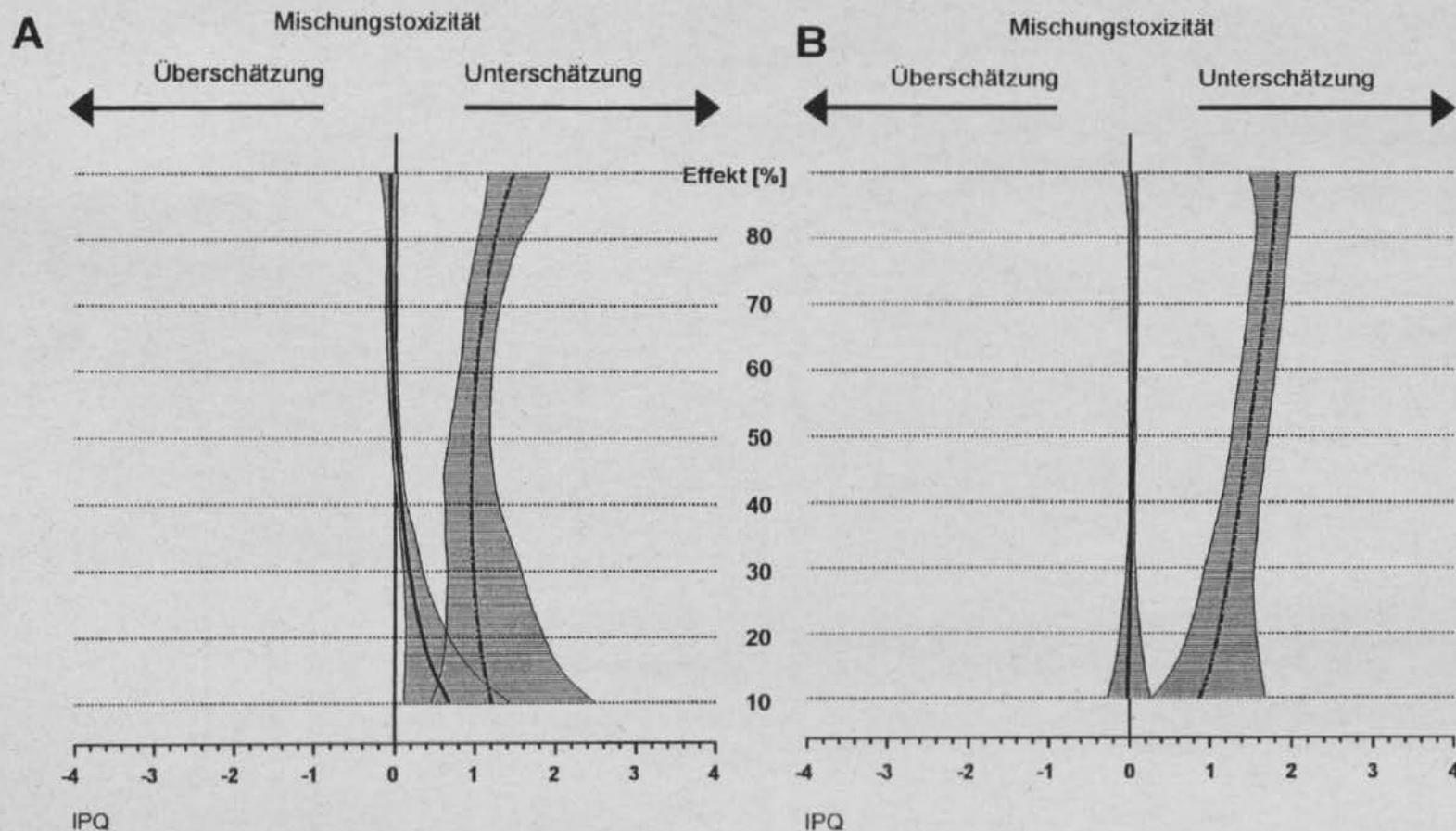


Abb. 7.3: IPQ-Analyse der Vorhersage-Genauigkeit für das Referenzgemisch *ähnlicher* Wirkung im Algentest

————— Index on Prediction quality für das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT (IPQ_{KA})

- - - - - Index on Prediction quality für das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG (IPQ_{UW})

Der 95 %-Konfidenzbereich der IPQ-Werte ist als schraffierte Fläche dargestellt.

A: Komponenten wurden im Verhältnis der EC₅₀-Konzentrationen gemischt

B: Komponenten wurden im Verhältnis der EC₀₁-Konzentrationen gemischt

Die *IPQ*-Analyse erhärtet den augenscheinlichen Befund eines exzellenten Prognosewertes des Konzeptes der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT für das Testgemisch *ähnlicher* Wirkung. Im Rahmen der geringen experimentellen Varianz kann weitgehend eine exakte Übereinstimmung von Vorhersagen und Beobachtungen der Mischungstoxizität festgestellt werden. Geringe, statistisch signifikante Abweichungen ergeben sich nur beim *EC*₅₀-Gemisch und nur für Effekte unterhalb von 40 %. Der höchste *IPQ*-Wert wird dann auf dem 10 %-Effektniveau mit +0.7 festgestellt. D.h. der vorhergesagte *EC*₁₀-Wert ist 1.7mal höher als die aus experimentellen Daten bestimmte *EC*₁₀.

Der *IPQ* für die Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG nimmt hingegen je nach Mischungsverhältnis und Effektniveau Werte zwischen +0.9 und +1.8 an. D.h. die vorhergesagten Effekt-Konzentrationen sind 1.9 bis 2.8mal höher als die beobachteten. Die statistische Unsicherheit der Vorhersagen ist durchweg größer als bei Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT. Die Unterschiede zwischen Vorhersagen und Beobachtungen sind aber dennoch stets statistisch signifikant.

Beurteilung des Vorhersagewertes der Konzepte

Insgesamt lassen die Ergebnisse die Frage nach der Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität für das Testgemisch *ähnlicher* Wirkung im Algentest bejahen. KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT liefert dabei durchweg die genauesten, meist sogar exakte Vorhersagen.

Für die Beurteilung der prognostischen Eignung der Vorhersage-Konzepte ist die erzielbare Vorhersage-Genauigkeit ausschlaggebend. Die Frage, ob geringe Abweichungen der Vorhersage von der Beobachtung statistisch signifikant sind oder nicht, ist hingegen höchstens von untergeordneter Bedeutung. Zum Verständnis dieser Einschätzung muß man in Betracht ziehen, daß die Breite der für den *IPQ* bestimmten Konfidenzintervalle die statistische Unsicherheit bei der Toxizitätsbestimmung von Einzelstoffen widerspiegelt und mit zunehmendem Datenumfang gegen Null tendiert (s. 6.3). Je höher der experimentelle Aufwand, desto größer die Chance, auch geringe Differenzen zwischen Beobachtung und Vorhersage noch als signifikant detektieren zu können. Was damit letztlich immer zum Vorschein gebracht werden kann, sind die Limitierungen der Vorhersage-Konzepte, die die komplexe Realität der Interaktion vieler Stoffe mit einem Biosystem in simplen Formeln zu beschreiben suchen. Aus biologischer Sicht erstaunlich ist deshalb nicht das Auftreten von Abweichungen, sondern die Tatsache, daß KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT tatsächlich sehr genaue Vorhersagen der Toxizität des Testgemisches liefert.

Die Frage, ob die mit einem Konzept erzielbare Vorhersage-Genauigkeit ausreichend oder nicht ausreichend ist, muß sich am Zweck bemessen, für den die Vorhersage getroffen wird. Angesichts der Größe der Unsicherheiten, mit denen die ökotoxikologische Risikobewertung in anderen Punkten zu kämpfen hat, können deshalb auch Fehleinschätzungen einer Effekt-Konzentration um den Faktor 1.9 oder 2.8 gegebenenfalls noch tolerierbar sein. Vorhersagen nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG wären damit für das Testgemisch immerhin noch als guter Näherungswert einzuschätzen. Unter Vorsorgegesichtspunkten ist allerdings nicht nur die Größe der Abweichungen von Vorhersagen und Beobachtungen, sondern vor allem auch deren Richtung in Betracht zu ziehen. Die Er-

gebnisse bestätigen in diesem Punkt die theoretische Überlegung, daß Vorhersagen der Mischungstoxizität unter der Hypothese UNABHÄNGIGER WIRKUNG eher die Gefahr der Unterschätzung bergen als Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT (s. 3.2).

Beitrag niedriger Effekt-Konzentrationen

Abschließend sollen die für das Testgemisch *ähnlicher* Wirkung im Algentest ermittelten Toxizitätsdaten daraufhin analysiert werden, ob eine deutliche Gesamt-Toxizität dann festgestellt werden kann, wenn die Einzelstoffe im Gemisch in Konzentrationen vorliegen, die alleine nur einen geringen, statistisch nicht signifikanten Effekt hervorrufen. Dazu werden nicht mehr die gesamten Konzentrations-Wirkungskurven der Gemische (Anhang D2.1) betrachtet, sondern nur noch ausgewählte Punkte auf diesen Kurven. Diese Punkte werden jeweils durch die Gesamtkonzentration der Wirkstoffe definiert. Aufgrund des fixen Mischungsverhältnisses sind damit gleichzeitig die Konzentrationen aller Einzelkomponenten festgelegt. Anhand der ermittelten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen kann einerseits der Gesamtkonzentration ein Gesamteffekt zugeordnet werden. Gleichzeitig kann aber auch kalkuliert werden, welchen Effekt die Einzelstoffe in den im Gemisch vorliegenden Konzentrationen jeweils alleine bewirken.

Im Falle des EC_{50} -Gemisches wird für diese Analyse diejenige Gesamtkonzentration gewählt, bei der die Konzentrationen aller 18 Einzelstoffe gerade $1/18$ der jeweiligen Einzelstoff- EC_{50} entspricht (Abb. 7.4A). Diese Gesamtkonzentration beträgt $0.146 \mu\text{mol/L}$ und bewirkt 50.3 % Hemmung der Algenreproduktion. Dieser Effekt wird, wie im rechten Teil der Abbildung veranschaulicht, durch KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT praktisch exakt vorhergesagt, während UNABHÄNGIGE WIRKUNG die Höhe des Effektes unterschätzt (Vorhersage 29.3 %). Vergleichend sind nun im linken Teil der Abbildung die Effekte aufgetragen, die die Mischungskomponenten in einer Konzentration von $1/18$ der Einzelstoff- EC_{50} rechnerisch jeweils alleine hervorrufen. Wegen der unterschiedlichen Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven sind diese unterschiedlich groß. Sie variieren zwischen Werten unter 1 % und maximal 4.9 %. Bei allen 18 *s*-Triazinen ist $1/18$ der EC_{50} aber eine Konzentration, die kleiner ist als diejenige Testkonzentration, die durch den DUNNETT-Test als NOEC ausgewiesen wird. Je nach Substanz entspricht $1/18$ der EC_{50} nur 20 bis 85 % der NOEC. Die Einzelstoff-Effekte sind nach diesem Kriterium also allesamt als nicht signifikant einzustufen.

Noch deutlicher wird das Ergebnis, wenn die Analyse in analoger Weise für das EC_{01} -Gemisch durchgeführt werden (Abb. 7.4B). Auf der Konzentrations-Wirkungskurve dieses Gemisches gibt es einen Punkt, an dem jede der 18 Mischungskomponenten gerade in der Konzentration vorliegt, für die die jeweilige Konzentrations-Wirkungsbeziehung einen statistisch nicht signifikanten Effekt von 1 % kalkulieren läßt. Je nach Substanz entspricht diese als *Benchmark* gesetzte Konzentration nur etwa 5 bis maximal 60 % der NOEC (s.o.). Die Gesamtkonzentration ist in diesem Falle gleich der Summe der EC_{01} -Werte und beträgt $0.08928 \mu\text{mol/L}$. Sie bewirkt einen deutlichen Gesamteffekt von 47.1 %. Die Prognose nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT (43.7 %) weicht davon nur um 3.4 % ab, während UNABHÄNGIGE WIRKUNG den Effekt wiederum deutlich unterschätzten läßt (Vorhersage 16.6 %).

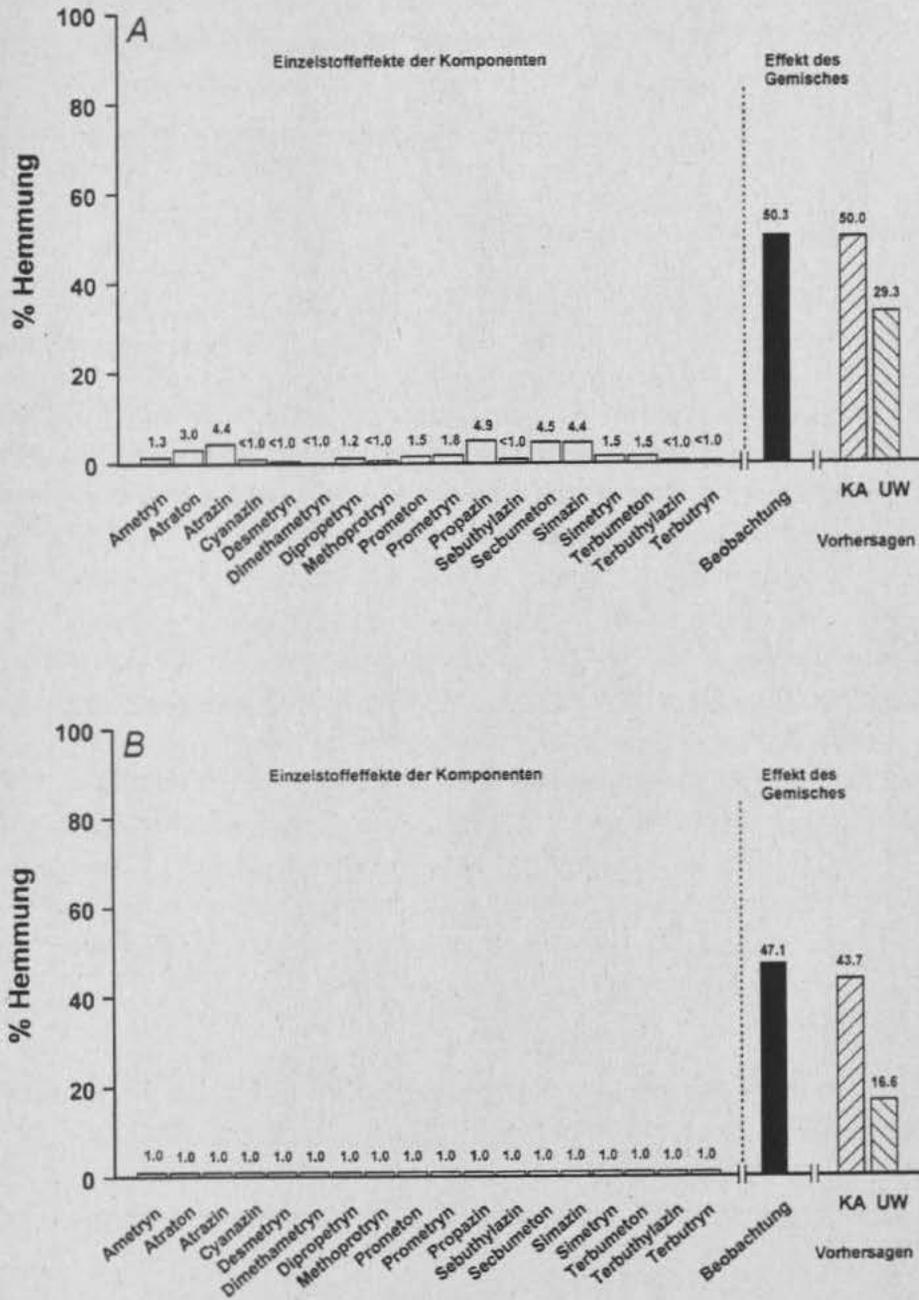


Abb. 7.4: Vergleich der Gesamteffekte von Gemischen mit den Effekten der einzelnen Komponenten: 16 *ähnlich* wirkende Mischungskomponenten im Algentest

- A** Mischungsverhältnis: EC₅₀ der Einzelstoffe
 Einzelstoffkonzentration: jeweils 1/16 der Einzelstoff-EC₅₀
 Gesamtkonzentration: 0.146 µmol/L
 - B** Mischungsverhältnis: EC₀₁ der Einzelstoffe
 Einzelstoffkonzentration: jeweils Einzelstoff-EC₀₁
 Gesamtkonzentration: 0.08928 µmol/L
- UW nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagter Gesamteffekt des Gemisches
 KA nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT vorhergesagter Gesamteffekt des Gemisches

Damit wird erstmals experimentell eindeutig belegt, daß die Hypothese *konzentrations-additiven* Zusammenwirkens von Stoffen auch dann eine valide Prognose liefert, wenn *ähnlich* wirkende Stoffe jeweils in Konzentrationen unterhalb der NOEC vorliegen. Sie können gemeinsam einen deutlichen Gesamteffekt hervorrufen. Die Fragestellung ist somit für das Beispiel eines Gemisches aus 18 s-Triazinen im Algentest zweifelsfrei beantwortet.

7.2 Ähnliche Wirkung im Leuchtbakterientest

Zusammensetzung der Testgemische

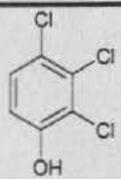
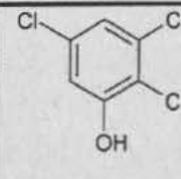
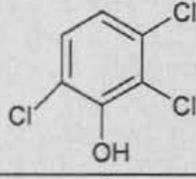
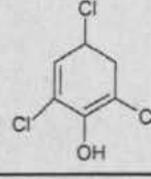
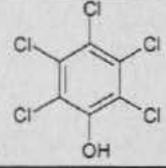
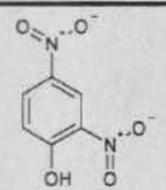
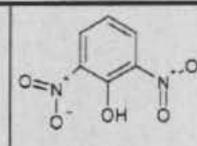
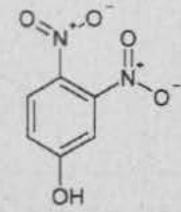
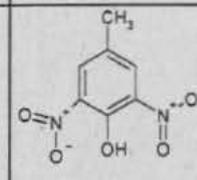
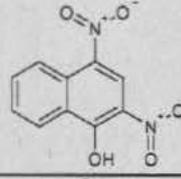
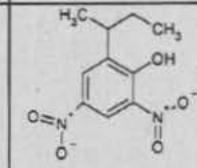
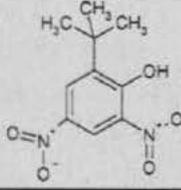
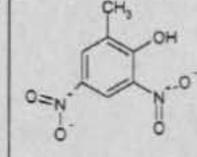
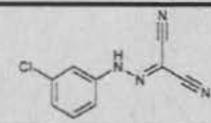
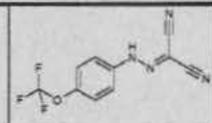
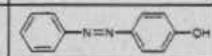
Die der Einzelstofftestung unterzogenen 16 Substanzen mit antizipiert gleichem Wirkmechanismus, nämlich Entkopplung der ADP-Phosphorylierung vom oxidativen Elektronentransportes, sind in Tabelle 7.3 dokumentiert. Die Mischungskomponenten sind allesamt schwache Säuren und umfassen verschiedene Chlor- und Nitrophenole sowie Dinitrilderivate. Wie schon von Terada (1990) formuliert, weisen alle Stoffe eine schwache Säurefunktion in Form einer Amino- oder Hydroxylgruppe, eine hydrophobe aromatische Einheit und mehrere elektronegative Substituenten wie Nitro- oder Halogenkomponenten auf. Einige der ausgewählten Substanzen finden als Wirkstoffe in Herbiziden Verwendung (DNOC, Dinoseb und Dinoterb), andere sind Massenchemikalien und gelten als von vorrangiger Bedeutung für die Belastung aquatischer Systeme (Trichlorphenole, Pentachlorphenol) (EG 1976). Alle Stoffe waren in akzeptabler Reinheit verfügbar, die Nitroverbindungen sind wegen ihrer explosiven Eigenschaften allerdings nur in befeuchtetem Zustand erhältlich, wodurch alle folgenden Konzentrationsangaben, entsprechend den in Anhang A2.2 enthaltenen Herstellerangaben zum Wassergehalt zu hoch liegen.

Toxizität der Einzelstoffe

Zur Ermittlung der Konzentrations-Wirkungskurven wurden die ausgewählten Einzelstoffe in mindestens 15 Konzentrationsstufen in geometrischer Reihe bei drei Replikaten und 11 Kontrollen eingesetzt. Die Konzentrationsstufen wurden so in den Bereich niedriger Effektkonzentrationen gelegt, daß die geschätzte EC_{01} in der Regel interpolativ ermittelt werden konnte.

Die auf %-Lumineszenzhemmung verrechneten Wirkdaten und das entsprechend Kapitel 6.3 regressionsanalytisch bestimmte *best fit* Modell sind im Anhang D1.3 für alle 16 Einzelstoffe graphisch wiedergegeben. In Tabelle 7.4 sind neben dem *best fit* Modell die daraus resultierenden Toxizitäts-Kennwerte zusammengestellt. Zusammenfassend visualisiert werden die Graphen aller Einzelstoffmodelle in Abbildung 7.6.

Tab. 7.3: Zusammensetzung des Referenzgemisches *ähnlich* wirkender Stoffe im Kurzzeit-Leuchtbakterientest (16 Entkoppler)

Substanz	Struktur	Substanz	Struktur
Chlorphenole			
2,3,4-Trichlorphenol		2,3,5-Trichlorphenol	
2,3,6-Trichlorphenol		2,4,6-Trichlorphenol	
Pentachlorphenol			
Dinitrophenole			
2,4-Dinitrophenol		2,6-Dinitrophenol	
3,4-Dinitrophenol		2,6-Dinitro-4-methylphenol	
2,4-Dinitro-1-naphtol		Dinoseb	
Dinoterb		DNOC	
Sonstige			
CCCP		FCCP	
		4-Phenylazophenol	

Tab. 7.4: Bakterientoxizität der 16 Einzelstoffe des Referenzgemisches *ähnlicher* Wirkung (Entkoppler)

Substanz	Modell ¹⁾	Modellparameter			Effekt- Konzentrationen		NOEC ³⁾ ($\mu\text{mol/L}$)	$\frac{EC_{01}}{EC_{50}}$	$\frac{NOEC}{EC_{01}}$
		$\hat{\theta}_1$	$\hat{\theta}_2$	$\hat{\theta}_3$	EC_{01} ($\mu\text{mol/L}$) ²⁾	EC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) ²⁾			
2,3,4-Trichlorphenol	Box-Cox-Weibull	-6.12	2.31	-0.095	1.98 [1.01-3.30]	17.25 [16.43-18.01]	5.49	0.1146	2.8
2,3,5-Trichlorphenol	Box-Cox-Weibull	-38.32	31.61	-0.738	8.15 [6.34-9.69]	19.05 [18.66-19.46]	9.56	0.4280	1.2
2,3,6-Trichlorphenol	Box-Cox-Weibull	-4.82	1.10	-0.047	1.23 [0.12-4.53]	90.6 [78.9-104.30]	9.82	0.0135	8.0
2,4,6-Trichlorphenol	Box-Cox-Probit	-2.57	0.94	-0.098	1.30 [0.60-2.20]	24.38 [22.13-26.71]	3.07	0.0533	2.4
2,4-Dinitro-1-naphtol	Box-Cox-Weibull	-9.79	5.29	-0.340	3.30 [1.83-4.68]	15.44 [14.57-16.40]	1.50	0.2136	0.5
2,4-Dinitrophenol	Box-Cox-Probit	-1.31	0.35	0.009	0.05 [0.01-0.14]	39.24 [35.64-43.42]	0.25	0.0014	4.6
2,6-Dinitro-4-methylphenol	Box-Cox-Probit	-2.31	0.65	0.030	0.98 [0.45-1.61]	29.76 [27.55-32.44]	3.24	0.0328	3.3
2,6-Dinitrophenol	Box-Cox-Probit	-4.48	1.22	-0.084	6.78 [3.92-11.0]	81.10 [73.49-88.43]	9.54	0.0836	1.4
3,4-Dinitrophenol	Weibull	-6.18	2.99		3.38 [2.15-5.31]	87.54 [78.83-95.91]	11.40	0.0386	3.4
4-Phenylazophenol	Box-Cox-Weibull	-2.08	0.78	-0.033	0.05 [0.01-0.13]	9.88 [9.15-10.67]	0.76	0.0046	16.8
CCCP	Box-Cox-Probit	0.25	1.20	0.054	0.10 [0.06-0.15]	0.81 [0.74-0.89]	0.17	0.1258	1.7
DNOC	Box-Cox-Probit	-3.06	0.59	0.111	3.20 [0.85-7.18]	58.95 [54.16-63.16]	9.85	0.0543	3.1
Dinoseb	Box-Cox-Logit	-5.05	1.79	0.005	1.29 [0.88-1.80]	16.40 [15.84-16.99]	3.44	0.0786	2.7
Dinoterb	Gen.Logit I	-7.71	6.62	0.706	1.51 [0.96-2.36]	12.20 [11.06-13.25]	4.91	0.1236	3.3
FCCP	Box-Cox-Probit	0.73	1.29	0.016	0.09 [0.05-0.14]	0.57 [0.49-0.65]	0.18	0.1568	2.0
Pentachlorphenol	Box-Cox-Probit	-4.88	2.34	-0.167	3.34 [2.44-4.31]	12.98 [12.29-13.84]	5.05	0.2572	1.5

¹⁾ siehe Abb. 6.1²⁾ In Klammern sind die unteren und oberen Grenzen des 95 %-Konfidenzintervalles angegeben³⁾ DUNNET-Test, siehe Kapitel 6.3.1

Die Spanne der statistisch ermittelten Effektkonzentrationen liegt auf mittlerem Effektniveau bei zwei Größenordnungen: FCCP als wirksamste Substanz mit einem EC_{50} -Wert von $0.57 \mu\text{mol/L}$ und 2,3,6-Trichlorphenol als am wenigsten wirksame Substanz mit einer EC_{50} von $90.6 \mu\text{mol/L}$. Auf dem EC_{01} -Niveau ist die Wirksamkeitsspanne ähnlich. Hier benötigt 2,3,5-Trichlorphenol mit $8.15 \mu\text{mol/L}$ die 177fache Konzentration der auf diesem Effektniveau wirksamsten Substanz 4-Phenylazophenol (EC_{01} von $0.046 \mu\text{mol/L}$).

Die protonophoren Entkoppler erweisen sich damit im Vergleich zu den s-Triazinen im Algentest als weniger wirksam und mit einer größeren Toxizitätsspanne versehen. Nach EG-Chemikalienkennzeichnungsvorschriften müssen die getesteten Verbindungen in die Klassen sehr giftig (CCCP, FCCP, Pentachlorphenol), schädlich (2,3,6-Trichlorphenol, 2,6-Dinitrophenol, 3,4-Dinitrophenol, DNOC) und giftig (alle übrigen) hinsichtlich ihrer Leuchtbakterientoxizität eingestuft werden.

Besondere Bedeutung haben für die Beurteilung der Mischungstoxizität in diesem Projekt die geschätzten EC_{01} -Werte, da sie als Operationalisierung unwirksamer Einzeleffektkonzentrationen (Benchmarks) dienen sollen. In Tabelle 7.4 sind die varianzanalytisch bestimmten NOEC-Konzentrationen und die EC_{01} -Schätzungen wiedergegeben. Hierbei erkennt man, daß für 15 der untersuchten 16 Stoffe der EC_{01} -Wert deutlich und bis zu mehr als einer Größenordnung unterhalb der ermittelten NOEC liegt. Zu berücksichtigen ist dabei, daß erheblich mehr Daten bei geringerer Variabilität vorliegen als bei üblichen NOEC-Bestimmungen, so daß vergleichsweise eher niedrigere Konzentrationen als NOEC erkannt werden. Der einzige Stoff im gesamten Vorhaben, bei dem die NOEC geringer als die aus der Konzentrations-Wirkungsfunktion geschätzte EC_{01} ausfällt, ist 2,4-Dinitro-1-naphthol. Die Wirkdaten sowie das Regressionsmodell sind in Abb. 7.5 dargestellt.

Deutlich erkennbar ist hierbei, daß von den 20 getesteten Konzentrationstufen der Bereich unterhalb der geschätzten EC_{10} mit einer höheren experimentellen Varianz behaftet ist (Heteroskedasizität). Die Varianz der Kontrollen ist wie in den übrigen Leuchtbakterientestungen außerordentlich gering (vgl. Definition des Hemmparameters im Anhang B2). Aufgrund dieser geringen Variabilität weist die Konzentrationsstufe von $1.9 \mu\text{mol/L}$ bereits sichtbare Effekte auf. Dies führt zu einer Bestimmung dieser Konzentration als LOEC im Dunnett-Test. Die NOEC liegt damit bei $1.5 \mu\text{mol/l}$. Diese Testentscheidung ignoriert dabei die Ergebnisse der fünf getesteten höheren Konzentrationsstufen im Bereich von $2-6 \mu\text{mol/L}$ mit insgesamt 25 Wirkdaten, die keinen sichtbaren Unterschied zur Kontrolle erkennen lassen. Die hier vorliegende NOEC-Bestimmung ist also als wenig plausibel anzusehen und unterstützt nachhaltig die Forderung nach dem Ersatz von NOEC-Werten durch auf Konzentrations-Wirkungs-Modelle gestützte EC-Werte (Lakowski 1995, Chapman, Cadwell und Chapman 1996, Moore und Caux 1997).

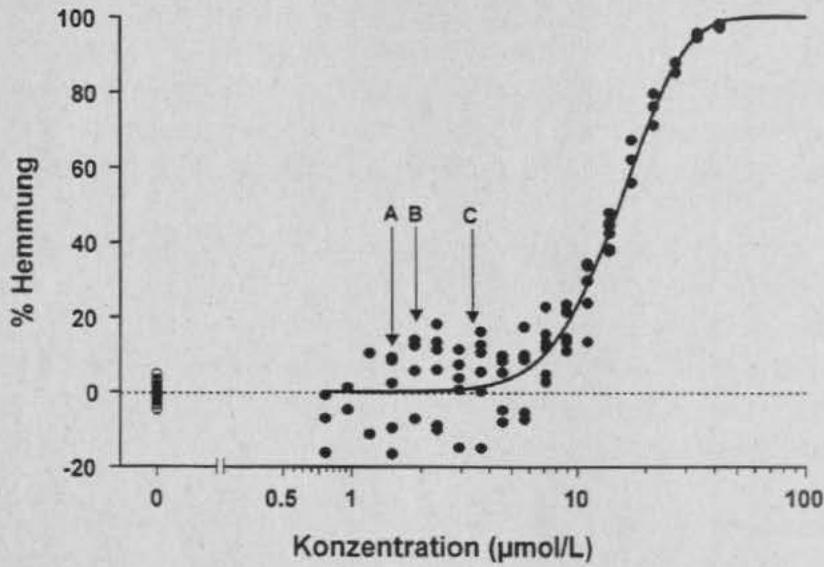


Abb. 7.5: Untypische Relation zwischen NOEC und der EC_{01} als Kenngröße niedriger Effektkonzentration im Falle von 2,4-Dinitro-1-naphthol im Leuchtbakterientest

A = NOEC, B = LOEC, C = EC_{01} (Erläuterung im Text)

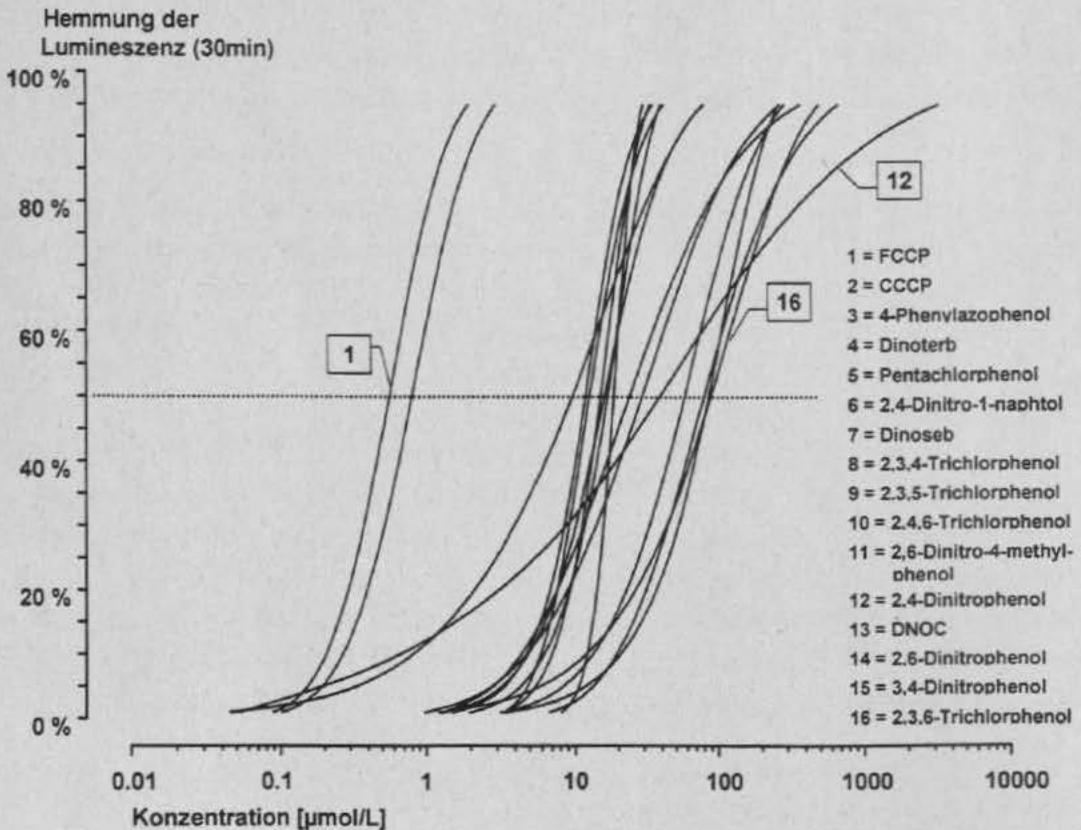


Abb. 7.6: Konzentrations-Wirkungskurven von 16 *ähnlich* wirkenden Substanzen im Leuchtbakterientest (Entkoppler)

Die Substanzen sind in der Reihenfolge ihrer EC_{50} -Werte aufgeführt

Die Reihenfolge der Wirksamkeiten der Substanzen ändert sich effektniveauabhängig aufgrund unterschiedlicher Steigungen der Konzentrations-Wirkungsfunktionen. Die Extreme lassen sich für den unteren Effektkonzentrationsbereich durch das Verhältnis der geschätzten EC_{50} - und EC_{01} -Werte beschreiben. So benötigt man bei 2,4-Dinitrophenol von der EC_{01} zur EC_{50} die 714-fache Konzentration, wohingegen man beim 2,3,5-Trichlorphenol nur die 2.3-fache Konzentration der EC_{01} einsetzen muß, um einen 50 %igen Effekt zu erzielen. Die überwiegende Zahl der untersuchten Entkoppler der Respiration weist in diesem Wirksamkeitsbereich allerdings nur Verhältnisse zwischen 4 bis 40 auf. Dies dokumentiert sich in dem ähnlichen Verlauf der ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven (Abb. 7.6).

Da der Wirkungsmechanismus für protonophore Entkoppler des respiratorischen Elektronentransportes einerseits nicht an eine Bindung an proteinogene Rezeptoren geknüpft ist und daher auch nicht in gängige Rezeptortheorien paßt, und andererseits die Vorstellung existiert, daß dieses Wirkprinzip in Prokaryonten nicht vorkommt (Jaworska und Schultz 1994), soll im folgenden eine kurze Betrachtung zur Spezifität der beobachteten Effekte auf der Basis quantitativer Struktur-Wirkungs-Zusammenhänge (QSAR) erfolgen.

Beim Vergleich der für die Einzelstoffe ermittelten Effektkonzentrationen mit Literaturangaben und einem QSAR-Modell für Entkoppler der Respiration (Schulz und Cronin 1997) beziehungsweise einem QSAR-Modell zur Minimumtoxizität nach der Narkosevorstellung (Hermens et al. 1985a) (vgl. Tabelle 7.5) fällt auf, daß die experimentellen Daten größenordnungsmäßig gut mit den Literaturbefunden zur Leuchtbakterientoxizität übereinstimmen. Eine Abweichung um deutlich mehr als den Faktor 2 ist nur bei der lipophilsten Substanz, dem Pentachlorphenol zu konstatieren. Auch die auf der Basis von Microtox-Daten mit schwachen Säuren von Schulz und Cronin (1997) für die Entkoppler des respiratorischen Elektronentransportes vorgeschlagene QSAR-Gleichung liefert brauchbare Übereinstimmungen zwischen aufgrund der QSAR erwarteter Toxizität und beobachteten Effekten. Abweichungen um mehr als den Faktor 2 zwischen Vorhersage und Beobachtung ergeben sich für 2,3,6-Trichlorphenol, 2,4-Dinitrophenol, CCCP, FCCP und wiederum Pentachlorphenol. Während 2,4-Dinitrophenol und die Dinitrilderivate CCCP und FCCP höhere Toxizitäten als nach Modellerwartung ausweisen, liegen die Toxizitäten des Trichlorphenols und Pentachlorphenols deutlich niedriger.

Im Vergleich zu einem von Hermens und Mitarbeitern (1985a) erstellten Basistoxizitäts-Modell anhand von Daten über 22 als Narkotika eingestufteten Stoffen, welches eine Basistoxizität allein auf der Basis des Verteilungsverhaltens zwischen Oktanol und Wasserphase beschreibt, läßt sich für die Mehrzahl der getesteten Verbindungen eine deutlich höhere Toxizität (ausgedrückt als TR in der Tabelle) erkennen. Dieses steht in Übereinstimmung mit dem erwarteten spezifischen entkoppelnden Effekt der Substanzen und bestätigt die Grundannahmen der Stoffauswahl dieses Projektes.

Tab. 7.5: Vergleichbarkeit der experimentellen Daten mit Erwartungen nach QSAR-Modellen auf dem EC₅₀-Effektniveau

Substanz	Molekular- gewicht	log Ko/w ¹	exp. Befunde ²	Ent- koppler- QSAR ³	Basistox- QSAR ⁴	Projektergebnisse		TR ⁵ QSAR/ exp. EC ₅₀	TR ⁵ Basistox/ exp. EC ₅₀
			mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	µmol/L		
2,3,4-Trichlorphenol	197.45	3.45		3.04	10.06	3.406	17.25	0.89	2.95
2,3,5-Trichlorphenol	197.45	3.45		3.04	10.06	3.761	19.05	0.81	2.67
2,3,6-Trichlorphenol	197.45	3.45		3.04	10.06	17.89	90.59	0.17	0.56
2,4,6-Trichlorphenol	197.45	3.45		3.04	10.06	4.814	24.38	0.63	2.09
2,4-Dinitro-1-naphtol	234.17	2.90		6.69	42.08	3.615	15.44	1.85	11.64
2,4-Dinitrophenol	184.11	1.73	11.0	19.64	482.76	7.224	39.24	2.72	66.83
2,6-Dinitro-4- methylphenol	198.14	2.27	9.05	11.51	150.77	5.896	29.76	1.95	25.57
2,6-Dinitrophenol	184.11	1.73		19.64	482.76	14.93	81.10	1.32	32.33
3,4-Dinitrophenol	184.11	1.73		19.64	482.76	16.12	87.54	1.22	29.95
4-Phenylazophenol	198.23	3.63	0.93	2.49	6.69	1.959	9.88	1.27	3.42
CCCP	204.62	3.75		2.24	5.24	0.166	0.813	13.47	31.51
Dinoseb	240.22	3.67		2.88	7.40	3.940	16.40	0.73	1.88
Dinoterb	240.22	3.64		2.98	7.92	2.930	12.20	1.02	2.70
DNOC	198.14	2.27		11.51	150.77	11.68	58.95	0.99	12.91
FCCP	254.17	4.15		1.78	2.61	0.116	0.567	15.33	22.48
Pentachlorphenol	266.34	4.74	0.52	0.96	0.71	3.458	12.98	0.28	0.21

¹ errechnet mit KOWWIN, Vers. 1.54 nach Meylan und Howard (1995);² experimentelle Befunde im Microtox-Test (Schulz und Cronin 1997);³ QSAR-Modell für Entkoppler: $1/\log pT30[\text{mmol/L}] = 0.489 \cdot \log K_{OW} + 0.126$ (Schulz und Cronin 1997);⁴ Basistoxizitäts-Modell: $\log(1/EC_{50}[\text{mmol/L}]) = 0.995 \cdot \log K_{OW} - 2.14$ (Hermens et al. 1985a);⁵ TR: toxic ratio aus erwarteter/beobachteter Toxizität.

Lediglich für die schon beschriebenen Verbindungen 2,3,6-Trichlorphenol und Pentachlorphenol ist die beobachtete Toxizität noch geringer ausgefallen als aufgrund des Basislinientoxizitätsmodells erwartet. Die herausragend schwache Toxizität des 2,3,6-Trichlorphenols (siehe Tabelle 7.4) ist auf niedrigem Effektniveau nicht wiederzufinden. Aufgrund der im Vergleich zu den anderen eingesetzten Trichlorphenolen geringeren Steigung der Konzentrations-Wirkungskurve weist 2,3,6-Trichlorphenol mit $1.23 \mu\text{mol/L}$ sogar die niedrigste EC_{01} unter den getesteten Trichlorphenolen aus. Eine QSAR-Gleichung auf anderem als EC_{50} -Effektniveau würde also auch zu anderen Urteilen kommen.

Für das Pentachlorphenol ist eine eindeutige Erklärung für die unerwartet niedrige Toxizität zunächst nicht in Sicht. Von den Stoffeigenschaften her fällt Pentachlorphenol aufgrund seiner hohen Lipophilie auf. Experimentelle Angaben zum $\log P_{o/w}$ liegen sogar oft noch höher als die hier errechneten 4.74 (Tabelle 7.5). Eine 10000fache Anreicherung in der lipophilen Phase kann methodische Probleme der Oberflächensorption in Pipetten und Inkubationsprobleme mit sich bringen. Die durchgeführte Nominalkonzentrationsanalytik bestätigt zwar eine 105 %ige Wiederfindung der Nominalkonzentration in den Testgefäßen, da jedoch nach der Applikation des Stoffes keine weitere Kontrollanalytik durchgeführt wurde, mag es hierbei zu Konzentrationsminderungen gekommen sein.

Andererseits müssen auch für diesen Fall die QSAR-Modelle auf ihre zumindest quantitative Tragfähigkeit befragt werden. So fällt auf, daß die QSAR für den narkotischen Effekt (Cronin und Dearden 1993) eine höhere Basistoxizität erwarten läßt als die QSAR für den spezifischen Effekt der protonophoren Entkopplung (Schulz und Cronin 1997). Demnach nimmt der Abstand zwischen den durch beiden QSAR-Gleichungen vorhergesagten Toxizitätswerten mit steigender Lipophilie ab. Dies steht jedoch zumindest für die Gruppe der Chlorphenole im Widerspruch zu der Beobachtung, daß der narkotische Effekt relativ zur entkoppelnden Wirkung umgekehrt gerade mit abnehmender Anzahl an Chlorsubstituenten und damit abnehmender Lipophilie zunimmt. Mono- und Dichlorphenole werden als polare Narkotika betrachtet (Bol et al. 1993). Möglicherweise sind also für Pentachlorphenol die auf QSAR-Basis errechneten Toxizitätserwartungen unzuverlässig. Eine eindeutige Klärung der Frage ist aber in diesem Projekt nicht notwendig, da zumindest für die übrigen 15 Mischungskomponenten kein grundsätzlicher Widerspruch zur Annahme einer spezifischen Wirkung im eingesetzten Leuchtbakterientest auftritt.

Toxizität der Gemische

Mit den ausgewählten und in ihren jeweiligen Konzentrations-Wirkungsbeziehungen charakterisierten Gemischkomponenten wurde die Toxizität von zwei Mischungen untersucht. Die 16 protonophoren Entkoppler wurden hierbei im Verhältnis ihrer EC_{50} -Werte und im Verhältnis ihrer EC_{01} -Werte gemischt. Die Ergebnisse der Konzentrations-Wirkungsuntersuchungen für beide Gemische finden sich im Anhang D2 dokumentiert. Für das EC_{50} -Gemisch wurde ein EC_{50} von $28 \mu\text{mol/L}$ und für das EC_{01} -Gemisch ein EC_{50} -Wert von $19 \mu\text{mol/L}$ kalkuliert. Diese beiden Effektkonzentrationen wie auch die Steigungen der ermittelten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen liegen somit im Wertebereich zwischen den wirksamsten und den am wenigsten wirksamen Einzelkomponenten. Auch die Da-

tenvariabilität, zu erkennen am geschätzten 95 %igen Vertrauensbereichsgürtel, ist mit der der Einzelstoffe vergleichbar.

Prüfung der Vorhersagbarkeit

Auf der Basis der für die Komponenten ermittelten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen können konzeptabhängig Prognosen zur erwarteten Mischungstoxizität punktweise kalkuliert werden. Diese sind für beide Konzepte und untersuchten Mischungen als Verlaufskurven in der Abb. 7.7 dargestellt. Zur optischen Einschätzung der Vorhersagbarkeit sind sämtliche experimentell bestimmten Wirkdaten mit abgebildet. Als Trend läßt sich erkennen, daß die experimentellen Befunde im niedrigeren Konzentrationsbereich sehr gut durch das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT vorhergesagt werden, während für das EC₅₀-Gemisch im Effektbereich über 40 % Hemmung und für das EC₀₁-Gemisch im Effektbereich über 60 % Hemmung eine zunehmend höhere Toxizität beobachtet wird als vorhergesagt. Abweichungen von der Vorhersage sind für beide Mischungen ab einer Konzentration von etwa 20 µmol/L erkennbar. Die Effektvorhersagen durch das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG unterscheiden sich deutlich von den experimentell beobachteten Kombinationseffekten. Die Mischungstoxizität wird hierbei deutlich unterschätzt. Ausnahme ist der Bereich von Hemmungen kleiner 10 % beim EC₅₀-Gemisch.

Genauigkeit der Vorhersagen

Zur quantitativen Beschreibung der Genauigkeit der konzeptabhängigen Mischungstoxizitätsvorhersagen wird der Index on Prediction Quality (IPQ) herangezogen (IPQ-Definition in 6.3.2 und Erläuterung zur Verwendung in 7.1). In Abbildung 7.8 sind die IPQ-Werte gegen den beobachteten Effekt des Gemisches für den Bereich von 10 % bis 90 % Hemmung aufgetragen und im Anhang E2 dokumentiert. Danach unterschätzt das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG die beobachtete Mischungstoxizität für beide Gemische über den gesamten analysierten Konzentrations-Wirkungsbereich deutlich. Im Falle des EC₅₀-Gemisches beträgt die Toxizitätsunterschätzung das 1.6- bis 2.7-fache, im Falle des EC₀₁-Gemisches immerhin das bis nahezu 4-fache. Für das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT ist im unteren Effektbereich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Prognose und Beobachtung zu konstatieren. Für das EC₅₀-Gemisch wird ab 40 % Gemischeffekt eine Differenz von 2.3 µmol/L (Prognosewert 24.3 µmol/L) und für das EC₀₁-Gemisch eine Differenz ab 50 % Gemischeffekt von 1.4 µmol/L (Prognosewert: 20.6 µmol/L) als bereits signifikante Unterschätzung des Kombinationseffektes beurteilt. Diese sich zu höheren Effektniveaus verstärkende Tendenz resultiert in einer maximalen Unterschätzung der Mischungstoxizität auf 90 %igem Effektniveau um das 1.7fache für das EC₅₀-Gemisch und das 1.4 fache im Falle des EC₀₁-Gemisches.

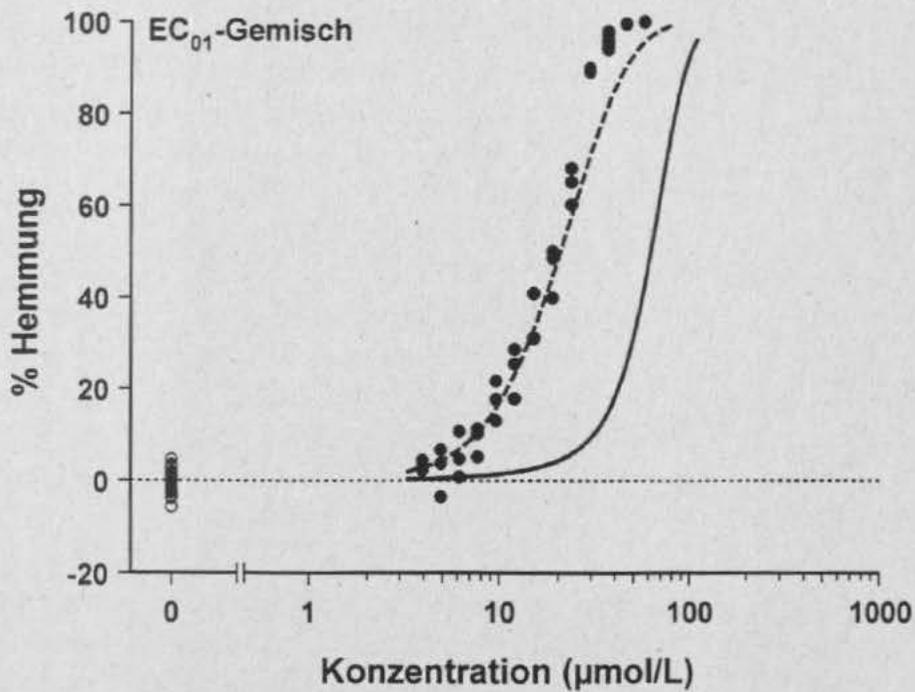
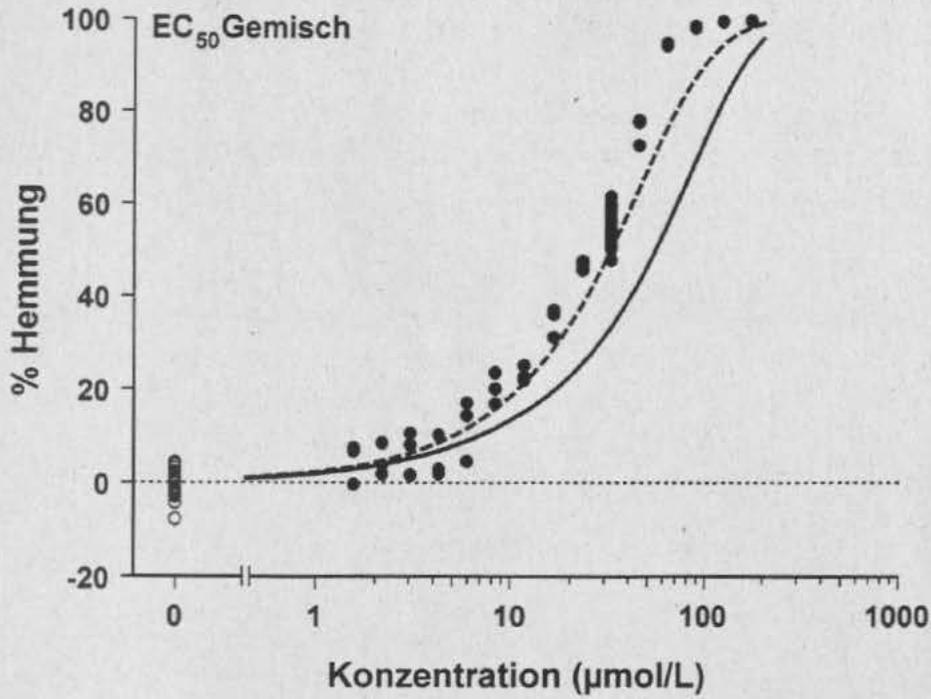


Abb. 7.7: Beobachtete und vorhergesagte Mischungstoxizitäten *ähnlich* wirkender Stoffe im Leuchtbakterientest

- Unbehandelte Kontrollen ● Behandelte Proben
- Vorhersage nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT
- Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG

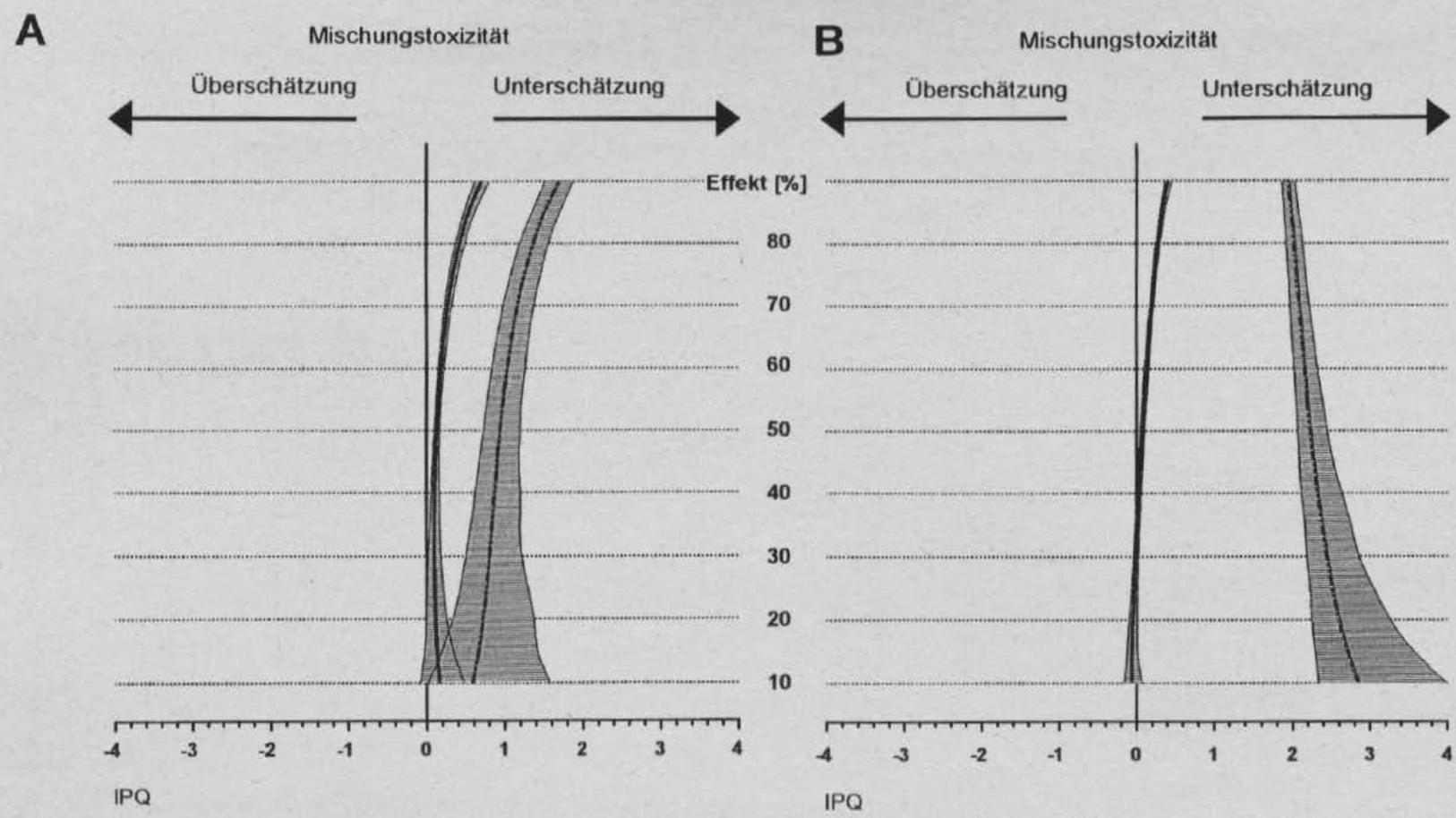


Abb. 7.8: IPQ-Analyse der Vorhersage-Genauigkeit für das Referenzgemisch *ähnlicher* Wirkung im Leuchtbakterientest

————— Index on Prediction quality für das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT (IPQ_{KA})
 - - - - - Index on Prediction quality für das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG (IPQ_{UV})

Der 95 %-Konfidenzbereich der IPQ-Werte ist als schraffierte Fläche dargestellt.

- A: Komponenten wurden im Verhältnis der EC₅₀-Konzentrationen gemischt
- B: Komponenten wurden im Verhältnis der EC₀₁-Konzentrationen gemischt

Es läßt sich also die Frage stellen, ob somit ein echter, wenn auch außerordentlich schwacher Synergismus zumindest für den Bereich höherer Effektniveaus für die Mischung von Entkopplern des respiratorischen Elektronentransportes im Biotest mit Leuchtbakterien befundet werden kann. Um dies zu klären, kann man sich der kritischen Frage nach der Einhaltung der konzeptionellen Voraussetzungen für die Gültigkeit von Konzentrations-Additivität widmen. Der Nachweis tatsächlicher Wirkungs-Ähnlichkeit der Mischungskomponenten wurde bereits mit Blick auf die mehr als narkotische Wirkung über eine quantitative Struktur-Wirkungsbeziehung geführt. Dabei erschien nur das Pentachlorphenol als auffällig. Dieses wiederum gilt allerdings in der ökotoxikologischen Literatur als „sicherer“ Entkoppler (Schüürmann 1998). Ein weiteres Indiz für das tatsächliche Vorliegen *ähnlicher* Wirkung ergibt sich durch die ähnliche Steilheit der Konzentrations-Wirkungsverläufe der Mischungskomponenten (Abbildung 7.6). Allerdings bildet das 2,4-Dinitrophenol hierbei mit seinem sehr flachen Kurvenverlauf eine Ausnahme. Sollte sich diese Substanz in ihrer Wirkungs-Ähnlichkeit tatsächlich von den anderen Gemischkomponenten unterscheiden, so wäre dies allerdings keine Erklärung für die beobachtete Richtung der Abweichung, da dann eher von einem Antagonismus bezüglich der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT auszugehen wäre.

Schließlich bleiben noch die Stoffe selbst. Unter den in der Mischung eingesetzten Stoffen finden sich einige, nämlich die Nitrophenole wie z.B. DNOC, die in den eingesetzten Konzentrationen eine gut sichtbare Gelbfärbung aufweisen. Eine Gelbfärbung der Testlösung stört die Detektion der bakteriellen Lumineszenz und zeigt eine scheinbare Leuchthemmung an, obwohl nur Lichtabsorption stattfindet. Die Befunde, daß die Leuchthemmungen in den Mischungen erst bei höheren Effektkonzentrationen von den Erwartungen zum stärkeren hin abweichen, und die Beobachtung, daß dies in beiden Mischungen im Konzentrationsbereich von etwa 20 µmol/L gleichermaßen auftritt, stützen die Annahme eines lichtabsorptiven Effektes. Da die spektralen Eigenschaften des verwendeten Detektionsphotomultipliers unbekannt sind, die Mischungskomponenten unterschiedliche Absorptionsspektren aufweisen und die Dämpfung der Lichtemission durch die gefärbte Testlösung stark von der Geometrie der Meßanordnung abhängt, ist eine theoretische Klärung des Sachverhaltes oder gar eine quantitative Betrachtung des möglichen Fehlers schwierig. Experimentell gibt es die Möglichkeit, mit Doppelkammergefäßen eine Einschätzung zur Relevanz der Meßergebnisverfälschung durch Lichtabsorption zu erlangen. Dabei wird in die innere Kammer die unbehandelte Bakteriensuspension gegeben und in die äußere jeweils die gefärbten Testgüter und dies mit Kontrollen verglichen. Leider müssen wegen der geringeren Volumina die Mengenverhältnisse verändert werden. Darüber hinaus stellte sich heraus, daß die Bakterien eine andere zeitliche Dynamik ihres Leuchtverhaltens aufwiesen, nämlich eine Abnahme in der Leuchtintensität über 30 Minuten, als in den Standardexpositionsgefäßen, was auf einen verringerten Sauerstoffaustausch über die verkleinerte Oberfläche zurückzuführen sein mag. Der zusätzliche Effekt durch eine gefärbte Lösung (in diesem Falle die höchste geteste Konzentration des EC₅₀-Gemisches) lag im Bereich von 10 % Hemmung. Damit läßt sich die Frage, ob die schwache aber signifikante Abweichung der Mischungstoxizität der protonophoren Entkoppler von der Erwartung nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT als methodisches

Artefakt oder als überadditiver Kombinationseffekt bezeichnet werden muß, nicht abschließend klären.

Beurteilung des Vorhersagewertes der Konzepte

Auch im Leuchtbakterientest konnte somit gezeigt werden, daß Mischungstoxizität für ein Testgemisch *ähnlicher* Wirkung vorhersagbar ist. Die Vorhersagegenauigkeit ist mit den Resultaten im Algentest vergleichbar. Erstaunlich ist wiederum die Genauigkeit, mit der die Toxizität des Gemisches durch das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT vorhersagbar ist. Die beobachteten Fehleinschätzungen in den Effektkonzentrationen um einen Faktor 1.6 bis maximal 4 nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG sind allerdings auch in diesen beiden Gemischtestungen relativ gering und deshalb immerhin als Näherungswert einzustufen. Aus Sicht der ökotoxikologischen Risikobewertung bedenklich ist allerdings, daß diese Näherungswerte eine Unterschätzung der Toxizität darstellen.

Beitrag niedriger Effekt-Konzentrationen

Für das Testgemisch protonophorer Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung im Leuchtbakterientest wurde abschließend untersucht, ob eine signifikante Gemischtoxizität auch dann beobachtet werden kann, wenn die Gemischkomponenten in ihren Einzelstoffkonzentrationen jeweils nur geringe, statistisch nicht signifikante Effekte hervorrufen. Hierfür wurde eine Gemischkonzentration gewählt, bei der sich für die beteiligten Komponenten aufgrund ihrer jeweiligen Konzentrations-Wirkungsfunktionen möglichst geringe Effekte ergeben, gleichzeitig aber ein deutlich bestimmbarer Gesamteffekt prognostiziert wurde. Im Falle des EC₅₀-Gemisches sind diese Einzeleffekte jedoch bei einer zu erwartenden Mischungstoxizität von 50 % nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT aufgrund der unterschiedlichen Steigungen der Konzentrations-Wirkungsverläufe der Einzelstoffe so unterschiedlich, daß einzelne Komponenten deutlich signifikante Effekte erwarten lassen (siehe auch Erläuterungen in 7.1). Für das EC₀₁-Gemisch hingegen lassen sich die Effekte der Einzelstoffe durch die gewählte Mischungsrelation über die Konzentrations-Wirkungsbeziehung auf geschätzte 1 % Effekt pro Komponente beschränken, was für die Einzelstoffe einem statistisch nicht signifikant meßbaren Effekt entspräche. Für diese Mischung ergibt sich im Leuchtbakterientest ein prognostizierter Kombinationseffekt nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT von immerhin 82 %.

Abbildung 7.9 zeigt die Ergebnisse dieses Experimentes zum Beitrag niedriger Effektkonzentrationen für beide Mischungsverhältnisse im Leuchtbakterientest. Es zeigt sich, daß für die EC₅₀-Mischung die geschätzten Einzeleffekte der im Gemisch enthaltenen Substanzkonzentrationen erwartungsgemäß stark unterschiedlich sind und einzelne Komponenten wie 2,4-Dinitrophenol, 4-Phenylazophenol und 2,3,6-Trichlorphenol statistisch signifikante Effekte erwarten lassen. Die Übereinstimmung mit der Erwartung nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT - 50 % Effekt des Gemisches bei einer Gesamtkonzentration von 32 µmol/L - ist mit einem beobachteten Kombinationseffekt von 55 % sehr gut und deutlich unterscheidbar von 33 % erwartetem Effekt nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG. Für das EC₀₁-Gemisch werden die Unterschiede noch deutlicher. Bei nur 1 %igen Effektschätzungen für die 16 Mischungskomponenten in einer Gesamtkonzentration von

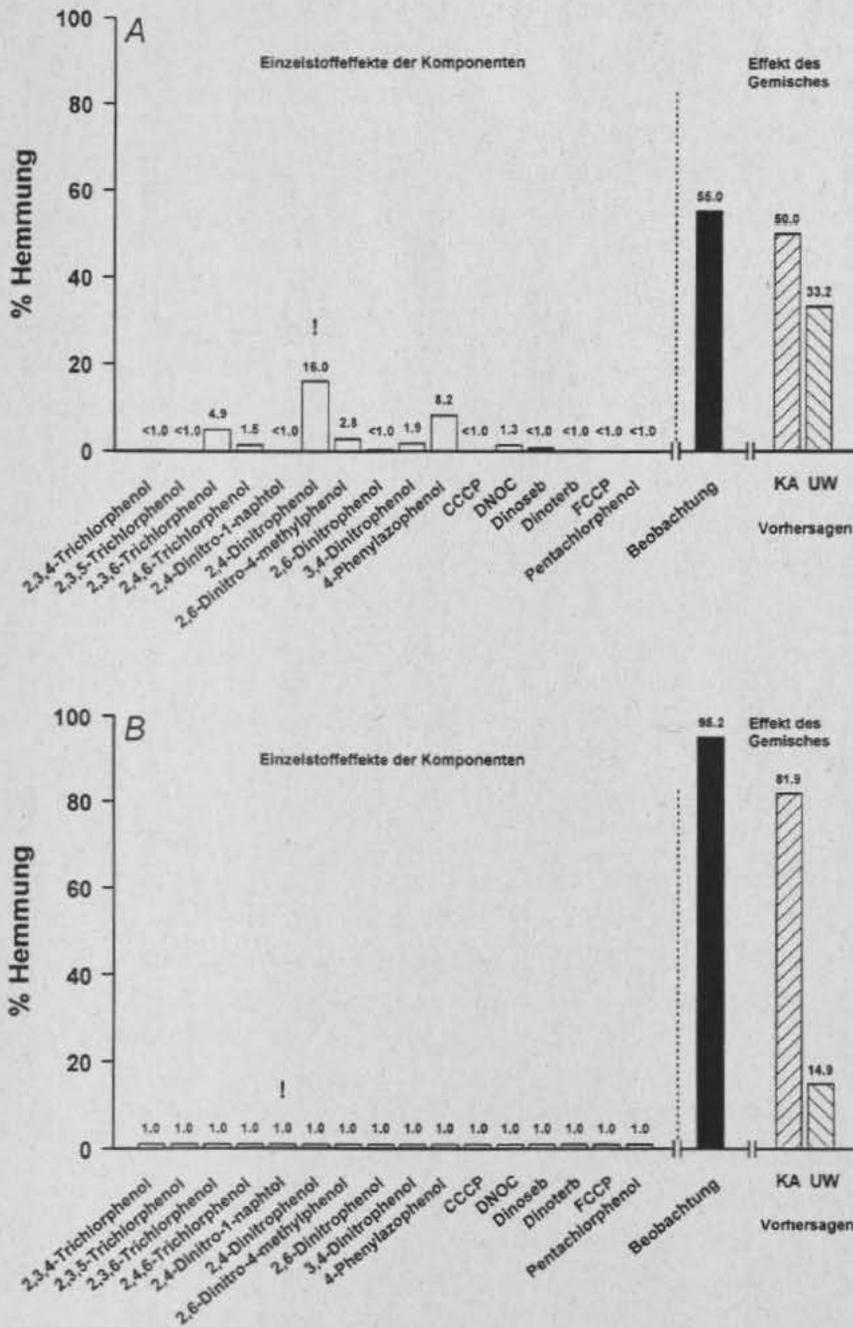


Abb. 7.9: Vergleich der Gesamteffekte von Gemischen mit den Effekten der einzelnen Komponenten: 16 *ähnlich* wirkende Mischungskomponenten im Leuchtbakterientest

- A** Mischungsverhältnis: EC_{50} der Einzelstoffe
 Einzelstoffkonzentration: jeweils $1/16$ der Einzelstoff- EC_{50}
 Gesamtkonzentration: $32,26 \mu\text{mol/L}$
- B** Mischungsverhältnis: EC_{01} der Einzelstoffe
 Einzelstoffkonzentration: jeweils Einzelstoff- EC_{01}
 Gesamtkonzentration: $36,71 \mu\text{mol/L}$
- UW nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagter Gesamteffekt des Gemisches
 KA nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT vorhergesagter Gesamteffekt des Gemisches
 ! Signifikante Effekte

37 $\mu\text{mol/L}$ weist die beobachtete Mischungstoxizität einen 95 %igen Effekt aus. Dem gegenüber stehen die Erwartungen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT von 82 % und nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG von 15 % Effekt. Nicht nur erweisen sich die Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT wie bereits im Algentest als deutlich präziser, sondern es wird wiederholt experimentell belegt, daß die Hypothese konzentrations-additiven Zusammenwirkens von Stoffen auch dann eine valide Prognose liefert, wenn *ähnlich* wirkende Stoffe jeweils in Konzentrationen unterhalb der NOEC vorliegen. Die Fragestellung ist somit auch für das Beispiel eines Gemisches aus 16 protonophoren Entkopplern im Leuchtbakterientest eindeutig beantwortet.

8 Mischungstoxizität unähnlich wirkender Stoffe

Untersuchungen zur Mischungstoxizität *unähnlich* wirkender Stoffe wurden sowohl im Leuchtbakterien-, als auch im Algentest durchgeführt. Um die Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität zu analysieren erfolgt eine Gegenüberstellung von prognostizierten und experimentell beobachteten Kombinationswirkungen. In Abschnitt 8.3 werden deshalb sowohl die experimentellen Ergebnisse, als auch die Prognosen nach den Konzepten von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG dargestellt und miteinander verglichen. Des Weiteren wird der Beitrag niedriger, allein nicht signifikant wirksamer Konzentrationen zur Mischungstoxizität untersucht. Zu diesem Zweck werden die Relationen zwischen einer beobachteten Mischungstoxizität und den zugrunde liegenden Einzelstofftoxizitäten analysiert (Abschnitt 8.4).

Vorab wird die Zusammensetzung der Testgemische vorgestellt und diskutiert (Abschnitt 8.1). Die Einzelstofftoxizität dieser als Mischungskomponenten eingesetzten Stoffe dient als Grundlage für die Vorhersagen der Mischungstoxizität und wird in Abschnitt 8.2 dargestellt.

8.1 Zusammensetzung der Testgemische

Aus den im Anhang A zusammengefaßten Auswahllisten wurden die Mischungskomponenten für beide Biotests ausgewählt. Dies geschah aufgrund der unterschiedlichen Physiologie der Testorganismen separat für beide Biotests. Die selektierten Mischungskomponenten sowie die bekannten Wirkorte und Wirkweisen sind in den Tabellen 8.1 und 8.2 zusammengefaßt.

Ziel der Stoffauswahl war es, jeweils eine Anzahl strikt *unähnlich* wirkender Stoffe für die zu generierende Mischung auszuwählen (zur Diskussion des Ähnlichkeitsbegriffes siehe Kapitel 3.4). Dabei sollten nach Möglichkeit Stoffe verwendet werden, die jeweils einen spezifischen, auf molekularer Ebene bekannten, Wirkungsmechanismus besitzen. Bei der Auswahl der Mischungskomponenten zeigte sich jedoch, daß das Wissen über die molekularen Interaktionen vieler Stoffe begrenzt ist. Für viele Stoffe ist lediglich die Wirkungsweise auf stoffwechselphysiologischer Ebene bekannt.

Ein Stoff wurde deshalb als *unähnlich* wirkend im Vergleich zu allen anderen Mischungskomponenten betrachtet, wenn mindestens eine der folgenden Bedingungen erfüllt war:

- **Ein auf molekularer Ebene verstandener Wirkungsmechanismus wird nur durch einen Stoff im Gemisch vertreten.**

In diesem Fall wurden auch mehrere Stoffe eingesetzt, die den gleichen Stoffwechselprozeß inhibieren. Im Leuchtbakterientest wurden beispielsweise drei Proteinbiosynthese-Inhibitoren eingesetzt (Tabelle 8.1). Von jedem dieser Stoffe sind jedoch die

molekularen Interaktionen die zur Wirkungsauslösung führen bekannt und einzigartig: Chloramphenicol bindet an die 50S-Untereinheit, Streptomycin an die 30S-Untereinheit der Ribosomen und Fusidinsäure bindet an den Elongationsfaktor G (O'Grady et al. 1997). Im Sinne eines strikten Ähnlichkeitsbegriffes sind diese Stoffe somit als *unähnlich* zu betrachten.

- Ein bestimmter Stoffwechselprozeß wird nur durch einen Stoff des Gemisches inhibiert.

Dabei wird impliziert, daß Stoffe, welche verschiedene Stoffwechselprozesse beeinflussen, auch unterschiedliche molekulare Wirkorte besitzen. Metazachlor beispielsweise hemmt spezifisch die Lipidbiosynthese, der zugrunde liegende molekulare Wirkungsmechanismus ist jedoch unbekannt (Hock, Fedtke und Schmidt 1995). Für den Anspruch des Projektes, strikt *unähnliche* Stoffe zu testen, ist Metazachlor somit geeignet, wenn die restlichen Mischungskomponenten andere stoffwechselphysiologische Prozesse inhibieren. Da dies, wie in Tabelle 8.2 zu sehen, der Fall ist, wurde Metazachlor als Mischungskomponente im Algentest eingesetzt.

Tab. 8.1: Zusammensetzung des Testgemisches *unähnlich* wirkender Stoffe im Leuchtbakterientest (14 Komponenten)

Substanz	Beeinflußter Stoffwechselprozeß	Wirkort	Verwendung
Diltiazem	Selektiver Ionentransport an Membranen	Ca ²⁺ -Kanäle	Analgetikum
Ethacrynsäure		Anionenkanäle	Diuretikum
8-Azaguanin	DNA-Synthese und -Funktionen	(Nukleotid-Analogon)	„Tool“
Actinomycin D		DNA-Doppelhelix (spezifische Interkalierung)	„Tool“
Nalidixinsäure		Gyrase	Antibiotikum
5-Fluoruracil	Nucleotid-Biosynthese	Thymidylat-Synthetase	Chemotherapeutikum
Azaserin		Purin- und Pyrimidin-Synthese	„Tool“
Chloramphenicol	Protein-Biosynthese	50S rRNA	Antibiotikum
Fusidinsäure		Elongationsfaktor-G	Antibiotikum
Streptomycin		30S rRNA	Antibiotikum
Metalaxyl	RNA-Synthese	RNA-Polymerase I	Fungizid
Ampicillin	Zellwand-Biosynthese	Mureinsynthetase	Antibiotikum
D-Cycloserin		Alaninisomerase	Antibiotikum
Dodecylpyridinium-bromid	Membranfunktionen	(Grenzflächenaktivität)	Desinfektionsmittel

„Tool“: Vorwiegend als Hilfsmittel in der stoffwechselphysiologischen Forschung verwendeter Stoff

Zusätzlich zu Stoffen, die diese Kriterien der Spezifität erfüllen, wurde in jedem der Testgemische ein kationisches Tensid aus der Gruppe der quaternären Ammoniumverbindungen eingesetzt (Dodecyltrimethyl-ammoniumchlorid im Algentest, Dodecylpyridiniumbromid im Leuchtbakterientest). Die Stoffe dieser Gruppe entfalten ihre Wirkung weder durch eine spezifische Wirkung im rezeptor-theoretischen Sinne, noch beeinflussen sie einen bestimmten Stoffwechselprozeß. Vielmehr stören sie aufgrund ihrer Grenzflächenaktivität sämtliche membranabhängigen Prozesse. Aufgrund dieser Wirkungscharakteristika sind sie eindeutig von allen anderen spezifisch wirkenden Komponenten zu differenzieren, so daß die Verwendung als Mischungskomponente gerechtfertigt schien.

Neben dem Kriterium der *Unähnlichkeit* mußten die Stoffe für die Untersuchungen im jeweiligen Biotest geeignet sein (siehe auch Kapitel 6.1). Für die ausgewählten Mischungskomponenten konnten im jeweiligen Biotest reproduzierbare, komplette Konzentrations-

Tab. 8.2: Zusammensetzung des Testgemisches *unähnlich* wirkender Stoffe im Algentest (16 Komponenten)

Substanz	Beeinflußter Stoffwechselprozeß	Wirkort	Verwendung
CCCP	Protonentranslokation und ATP-Synthese	(Protonophorer Entkoppler)	„Tool“
Fenfuram	Respiratorischer Elektronentransport	Succinat-Ubichinon-Oxidoreductase (Komplex II)	Fungizid
Kresoxim		Cytochrom-BC Komplex III	Herbizid
Paraquat	Photosynthetischer Elektronentransport	Redoxkatalase (PS I)	Herbizid
Terbutylazin		D1-Protein des PS II	Herbizid
Azaserin	Nucleotid-Biosynthese	Purin- und Pyrimidin-Synthese	„Tool“
Metalaxyl	RNA-Synthese	RNA-Polymerase I	Fungizid
8-Azaguanin	DNA-Synthese und -Funktionen	(Nukleotid-Analoga)	„Tool“
Nalidixinsäure		Gyrase	Antibiotikum
Metazachlor	Lipid-Biosynthese	unbekannt, jedoch nicht Acetyl-CoA-Carboxylase	Herbizid
Metsulfuron	Aminosäure-Biosynthese	Acetolactat-Synthetase	Herbizid
Chloramphenicol	Protein-Biosynthese	50S rRNA	Antibiotikum
Norflurazon	Carotinoid-Biosynthese	Phytoendesaturase	Herbizid
Triadimenol	Steroid-Biosynthese	Cytochrom P450 Steroid-14- α -Demethylasen	Fungizid
Aclonifen	Porphyrin-Biosynthese	Protoporphyrinogenoxidase	Herbizid
Dodecyltrimethylammoniumchlorid	Membranfunktionen	(Grenzflächenaktivität)	Desinfektionsmittel

„Tool“ : Vorwiegend als Hilfsmittel in der stoffwechselfysiologischen Forschung verwendeter Stoff

Wirkungsbeziehungen ermittelt werden. Des Weiteren sind die Stoffe unter den jeweiligen Testbedingungen über die entsprechende Testdauer chemisch und physikalisch stabil.

Als Mischungskomponenten wurden 14 *unähnlich* wirkende Stoffe im Leuchtbakterientest eingesetzt. Das im Algentest untersuchte Gemisch beinhaltet 16 verschiedene Komponenten. Nur wenige Stoffe (8-Azaguanin, Azaserin, Chloramphenicol, Metalaxyl und Nalidixinsäure) wurden in beiden Biotests verwendet. Der Großteil der Mischungskomponenten entfaltet seine spezifische Wirkung lediglich in einem der beiden Biotests (z.B. Hemmung der Photosynthese oder der bakteriellen Zellwandbiosynthese) und wurde deshalb nur in einem der Gemische verwendet. Im Gegensatz dazu inhibieren die in beiden Gemischen vertretenen Stoffe basale, beiden Organismen gemeinsame Stoffwechselprozesse wie z.B. die Proteinbiosynthese.

Viele der Mischungskomponenten des Leuchtbakterientestes wirken auf Biosynthese-Prozesse, die im Biolumineszenzhemmtest nach DIN 38412 Teil 34 mit einer Inkubationszeit von nur 30 Minuten nicht zum Tragen kommen (Backhaus et al. 1997). Er war somit für die Kombinations-Wirkungsanalyse ungeeignet.

Ein Großteil der ausgewählten Stoffe findet als Biozide Verwendung. So werden viele der für den Leuchtbakterientest ausgewählten Stoffe als Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt (O'Grady et al. 1997), während viele der Mischungskomponenten des Algentestes als Herbizide Verwendung finden (Tomlin 1994). Aufgrund dieser Art der Verwendung und der teilweise hohen Verbrauchsmengen ist bei diesen Stoffen von einer tatsächlichen oder zumindestens potentiellen Exposition aquatischer Organismen auszugehen (z.B. Römbke, Knacker und Stahlschmidt-Allner 1996, Halling-Sørensen et al. 1998, Grimme et al. 1994).

8.2 Toxizität der Einzelstoffe

Für die ausgewählten Mischungskomponenten wurde die Einzelstoff-Toxizität im jeweiligen Biotest nach den in Kapitel 6 näher dargestellten Verfahren bestimmt. Die Ergebnisse der Einzelstofftestungen sollen im Folgenden vorgestellt und hinsichtlich Datenqualität, Modellierung der Daten, beobachteter Toxizitäten sowie der resultierenden NOEC's diskutiert werden.

Datenqualität

Zur Veranschaulichung der Datenqualität, die der Bestimmung der Einzelstoff-Toxizität zugrunde liegt, sind im folgenden zwei typische Datensätze exemplarisch dargestellt. Eine komplette Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurven aller Einzelstoffe findet sich in Anhang D1.

In Abbildung 8.1 sind sowohl die experimentell ermittelten Toxizitätsdaten des Algentestes als auch die daran angepaßte Konzentrations-Wirkungskurve für Metsulfuronmethyl dargestellt. Deren Verlauf wird durch insgesamt 48 Datenpunkte unter Bezug auf

36 Kontrollen¹ bestimmt. Dabei sind die experimentell analysierten Konzentrationen gleichmäßig über den gesamten Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve verteilt. Diese Datenlage erlaubt die Kalkulation einer im Bereich von 1 % bis über 95 % Hemmung statistisch validen Konzentrations-Wirkungsbeziehung.

Mit einer Standardabweichung von 2 % Hemmung ist die Kontrollenvariabilität als gering einzustufen. Auch die größten Abweichungen betragen in diesem Beispiel nicht mehr als 10 %. Im Mittel aller 532 für die Einzelstofftestungen *unähnlich* wirkender Stoffe verwendeten Kontrollen beträgt die Standardabweichung ± 4.4 % Hemmung.

Die EC_{50} von Metsulfuron-methyl liegt bei 4 $\mu\text{mol/L}$. Das 95 % Konfidenzintervall dieser Effektkonzentration beträgt lediglich ± 0.09 $\mu\text{mol/L}$, was einer Breite von 4.5 % der EC_{50} entspricht. Im Mittel aller Konzentrations-Wirkungsbeziehungen, die im Algentest für *unähnlich* wirkende Stoffe erhoben worden sind, beträgt die Breite des 95 %-Konfidenzintervalles 16.3 % der geschätzten EC_{50} . Die Unsicherheit der EC_{01} -Schätzung ist größer, die Breite des 95 % Konfidenzintervalles beträgt hier durchschnittlich 74.9 %.

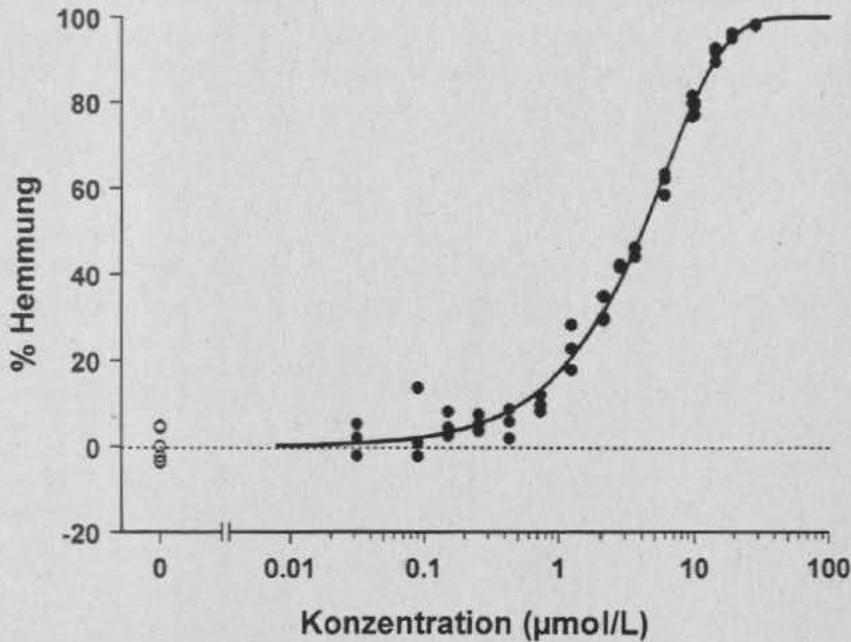


Abb. 8.1: Toxizität von Metsulfuron-Methyl im Algenbiotest
 ○ Unbehandelte Kontrollen ● Behandelte Proben
 — Konzentrations-Wirkungskurve (Weibull-Modell)

¹ Die Anzahl der verwendeten Kontrollen ist in diesem Beispiel aufgrund der speziellen experimentellen Herangehensweise überdurchschnittlich groß.

In Abbildung 8.2 ist die im Leuchtbakterientest bestimmte Toxizität von 8-Azaguanin dargestellt. 48 Datenpunkte beschreiben unter Bezug auf 19 Kontrollen den gesamten Effektbereich. Die an diese Daten angepaßte Konzentrations-Wirkungsbeziehung erlaubt statistisch valide Bestimmungen von Effektkonzentrationen im Bereich 1 % bis 95 % Effekt. In diesem Beispiel beträgt die Standardabweichung der Kontrollen 4 % Hemmung.

Im Mittel aller Einzelstofftestungen (223 Kontrollen) beträgt sie 2.5 % Hemmung. Die Kontrollvariabilität ist somit kleiner als im Algenbiotest. Die Unsicherheiten der Effektkonzentrationsschätzungen sind jedoch im Leuchtbakterientest und Algentest sehr ähnlich. So beträgt die durchschnittliche Breite des 95 % Konfidenzintervalles der EC_{50} im Leuchtbakterientest 13.5 % der geschätzten EC_{50} , während sie im Algentest 16.3 % beträgt.

Im Mittel aller Einzelstofftestungen (223 Kontrollen) beträgt sie 2.5 % Hemmung. Die Kontrollvariabilität ist somit kleiner als im Algenbiotest. Die Unsicherheiten der Effektkonzentrationsschätzungen sind jedoch im Leuchtbakterientest und Algentest sehr ähnlich. So beträgt die durchschnittliche Breite des 95 % Konfidenzintervalles der EC_{50} im Leuchtbakterientest 13.5 % der geschätzten EC_{50} , während sie im Algentest 16.3 % beträgt.

Die Anforderung an die Datenqualität, eine valide biometrische Konzentrations-Wirkungsanalyse für den Bereich von 1 % Effekt bis mindestens 80 % Effekt sowie eine Abschätzung der Varianzstruktur zu ermöglichen, ist damit für beide Beispiele erfüllt. Dies gilt auch für alle weiteren im Leuchtbakterien- und Algentest durchgeführten Konzentrations-Wirkungsanalysen. Diese sind in Anhang D dokumentiert.

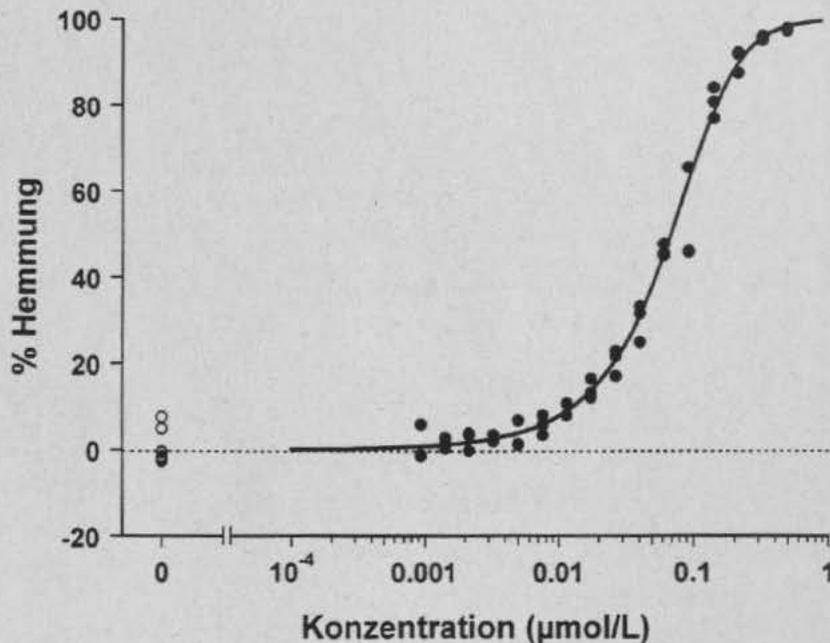


Abb. 8.2: Toxizität von 8-Azaguanin im Langzeit-Leuchtbakterientest
 ○ Unbehandelte Kontrollen ● Behandelte Proben
 ————— Konzentrations-Wirkungskurve (Generalisierter Logit)

Modellierung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen

Auf Grundlage der experimentell ermittelten Toxizitätsdaten beider Biotests wurde mit Hilfe von 10 parametrischen, nichtlinearen Regressionsmodellen die jeweilige Konzentrations-Wirkungsbeziehung kalkuliert (siehe auch Kapitel 6.3). Das Modell, welches die bestmögliche Anpassung an die jeweiligen experimentellen Daten lieferte, ist zusammen mit den jeweiligen Parameterschätzern in den Tabellen 8.3 und 8.4 aufgeführt. Die resultierenden Konzentrations-Wirkungskurven sind in Abbildung 8.3 für den Algentest und Abbildung 8.4 für den Leuchtbakterientest visualisiert.

Im Algentest erwiesen sich das Weibull-Modell in seiner originären Form oder mit Box-Cox-Transformation, sowie das *Generalisierte Logit*-Modell als am Besten geeignet. Für 14 von 16 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen lieferten diese drei Modelle die besten Anpassungen an die experimentellen Daten. Auch im Leuchtbakterientest zeigte sich die Leistungsfähigkeit des *Generalisierten Logit*-Modelles. 5 der insgesamt 14 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen konnten bestmöglich durch dieses Modell beschrieben werden. Weitere 6 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen wurden durch Box-Cox-transformierte Modelle am besten beschrieben.

Bei lediglich 7 der insgesamt 30 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zeigten sich die in der aquatischen Toxikologie gebräuchlichen Standardmodelle (Logit, Probit, Weibull) den anderen Modellen überlegen. Insbesondere die 2-parametrischen Logit- und Probit-Modelle liefern offensichtlich nur im Einzelfall die besten Anpassungen. Sie wurden lediglich für je eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung verwendet. Die ebenfalls untersuchten 2-parametrischen Morgan-Mercier- und Aranda-Ordaz-Modelle erwiesen sich in keinem der beobachteten Fälle als den anderen Modellen überlegen.

Zusammenfassend läßt sich eine Überlegenheit der 3-parametrischen Modelle erkennen, wobei das *Generalisierte Logit*-Modell für die hier untersuchten Stoffe und Biotests eine herausragende Rolle spielt. Trotzdem werden insgesamt sieben verschiedene Modelle zur Beschreibung der experimentellen Daten verwendet. Die Verläufe der Konzentrations-Wirkungskurven sind offensichtlich so verschieden, daß die Verwendung eines Pools von mehreren Modellen und eine fallweise Entscheidung für das jeweilige *best fit* Modell zu einer besseren biometrischen Beschreibung der Toxizitätsdaten führt, als die Verwendung eines oder weniger Standardmodelle.

Charakterisierung der Einzelstofftoxizitäten

Die Spanne der beobachteten EC_{50} -Werte umfaßt in beiden Biotests etwa 5 Größenordnungen (Tabelle 8.3 und 8.4). Diese wird auch durch die unterschiedliche Lage der Konzentrations-Wirkungskurven in den Abbildungen 8.3 und 8.4 veranschaulicht. Daneben fallen die Unterschiede in Form und Steigung der Konzentrations-Wirkungskurven auf. Die Wirkungs-Unähnlichkeit der Stoffe scheint durch diese Unterschiede widergespiegelt zu werden.

Tab. 8.3: Algentoxizität der 16 Einzelstoffe des Gemisches *unähnlicher* Wirkung

Substanz	Modell ¹⁾	Modellparameter			Effekt- Konzentrationen		NOEC ³⁾ ($\mu\text{mol/L}$)	$\frac{EC_{01}}{EC_{50}}$	$\frac{NOEC}{EC_{01}}$
		$\hat{\theta}_1$	$\hat{\theta}_2$	$\hat{\theta}_3$	EC_{01} ($\mu\text{mol/L}$) ²⁾	EC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) ²⁾			
8-Azaguanin	Gen.Logit I	-0.24	4.05	0.335	0.0005 [0.0002-0.0028]	0.3800 [0.3181-0.4338]	0.0067	0.001	14.7
Aclonifen	Box-Cox-Weibull	2.40	0.41	-0.340	0.0035 [0.0017-0.0057]	0.0297 [0.0274-0.0320]	0.0053	0.118	1.5
Azaserin	Gen.Logit I	-3.87	5.25	0.263	0.0026 [0.0011-0.0067]	1.7803 [1.6675-1.9131]	0.0131	0.001	5.1
CCCP	Box-Cox-Weibull	-0.62	1.21	-0.316	0.1049 [0.0245-0.2413]	1.2366 [0.9751-1.5945]	0.1650	0.085	1.6
Chloramphenicol	Box-Cox-Probit	-3.70	1.50	-0.213	2.7531 [0.9342-4.7238]	32.5 [25.4-43.4]	8.4650	0.085	3.1
Fenfuram	Weibull	-1.91	2.43		0.0784 [0.0576-0.1056]	4.32 [4.11-4.53]	0.4133	0.018	5.3
Kresoxim-methyl	Box-Cox-Weibull	-1.22	1.35	-0.332	0.1611 [0.0496-0.3286]	2.04 [1.89-2.19]	0.4820	0.079	3.0
Metalaxyl	Weibull	-6.77	2.77		6.0831 [4.1940-8.3750]	204.9 [190.6-218.3]	17.6	0.030	2.9
Metazachlor	Box-Cox-Weibull	6.61	5.78	0.472	0.0054 [<0.001 -0.0527]	0.1676 [0.1553-0.1867]	0.0551	0.032	10.2
Metsulfuron-Methyl	Weibull	-1.66	2.15		0.0430 [0.0334-0.0545]	4.02 [3.83-4.18]	0.4335	0.011	10.1
Nalidixinsäure	Weibull	-6.89	3.27		5.0119 [3.5872-6.8602]	98.7 [94.3-103.6]	14.3	0.051	2.9
Norflurazon	Logit	14.02	8.28		0.0056 [0.0048-0.0065]	0.0203 [0.0195-0.0209]	0.0099	0.279	1.8
Paraquat	Gen.Logit I	1.71	4.99	2.566	0.2163 [0.1352-0.2841]	0.7811 [0.7492-0.8261]	0.3396	0.277	1.6
Dodecyltrimethylammoniumchlorid	Gen.Logit I	122.34	86.36	0.078	0.0079 [0.0066-0.0095]	0.0302 [0.0295-0.0310]	0.0165	0.261	2.1
Terbutylazin	Weibull	4.16	3.91		0.0057 [0.0044-0.0073]	0.0693 [0.0658-0.0725]	0.0097	0.083	1.7
Triadimenol	Gen.Logit I	-9.99	13.97	0.272	0.3190 [0.2063-0.5325]	3.46 [3.25-3.72]	0.9044	0.092	2.8

¹⁾ Siehe Abb. 6.1

²⁾ In Klammern sind die unteren und oberen Grenzen des 95 % Konfidenzintervalles angegeben

³⁾ DUNNET-Test, siehe Kapitel 6.3.1

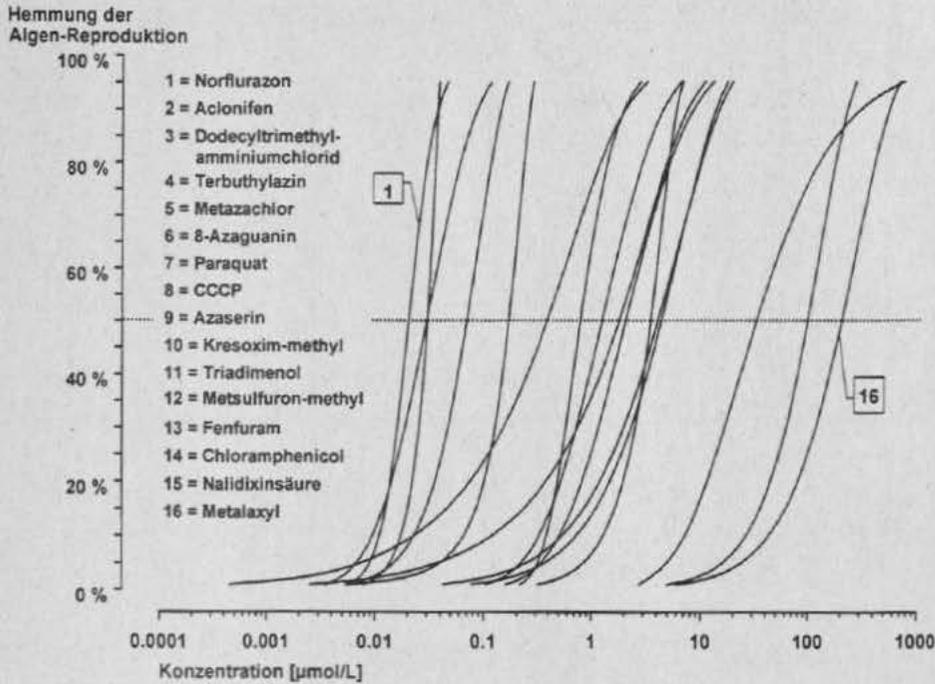


Abb. 8.3: Konzentrations-Wirkungskurven von 16 *unähnlich* wirkenden Substanzen im Algentest
 Die Substanzen sind in der Reihenfolge ihrer EC_{50} -Werte aufgeführt

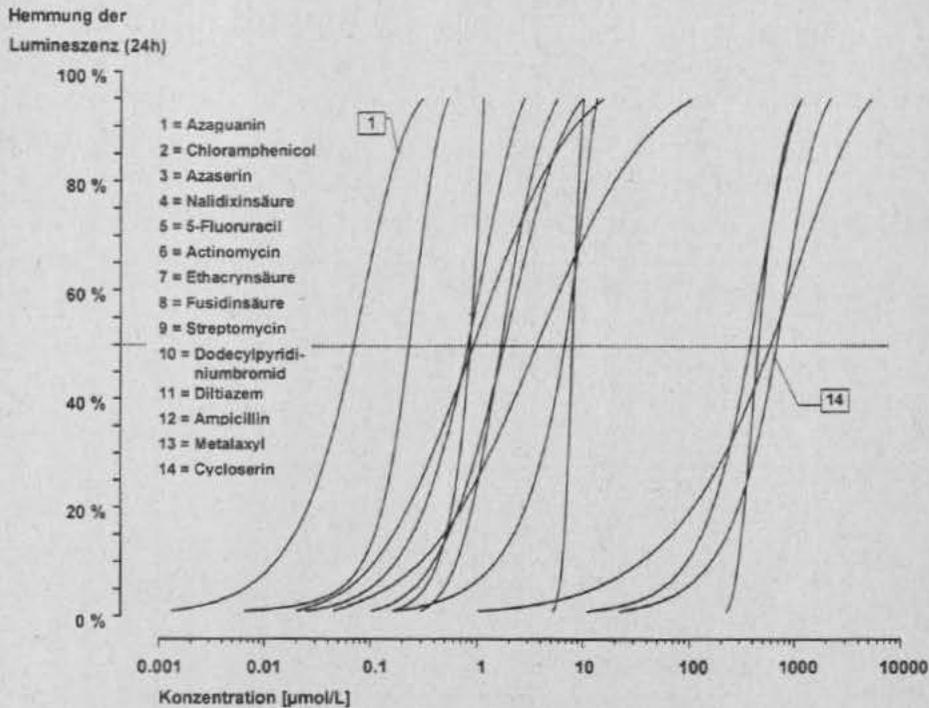


Abb. 8.4: Konzentrations-Wirkungskurven von 14 *unähnlich* wirkenden Substanzen im Langzeit-Leuchtbakterientest
 Die Substanzen sind in der Reihenfolge ihrer EC_{50} -Werte aufgeführt

Tab. 8.4: Bakterientoxizität der 14 Einzelstoffe des Gemisches *unähnlicher* Wirkung

Substanz	Modell ¹⁾	Modellparameter			Effekt- Konzentrationen		NOEC ³⁾ ($\mu\text{mol/L}$)	$\frac{EC_{01}}{EC_{50}}$	$\frac{NOEC}{EC_{01}}$
		$\hat{\theta}_1$	$\hat{\theta}_2$	$\hat{\theta}_3$	EC_{01} ($\mu\text{mol/L}$) ²⁾	EC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) ²⁾			
5-Fluoruracil	Box-Cox-Probit	0.05	0.59	-0.015	0.0205 [0.0137-0.0295]	0.92 [0.84-1.01]	0.0519	0.022	2.5
Actinomycin	Probit	-0.70	3.09		0.2965 [0.2282-0.3909]	1.68 [1.55-1.83]	0.5124	0.177	1.7
Ampicillin	Gen.Logit I	-11.46	6.37	160.9	225.92 [192.61-257.59]	450 [429-470]	253.5	0.502	1.1
8-Azaguanin	Gen.Logit I	4.81	5.32	0.438	0.0013 [0.0009-0.0020]	0.07 [0.066-0.074]	0.0076	0.019	5.8
Azaserin	Weibull	-0.13	2.79		0.0251 [0.0166-0.0366]	0.83 [0.77-0.89]	0.0414	0.030	1.7
Chloramphenicol	Box-Cox-Logit	6.09	5.90	0.510	0.0066 [<0.0001 -0.0205]	0.23 [0.22-0.24]	0.0484	0.028	7.4
Cycloserin	Gen.Logit I	-21.45	7.02	0.384	22.17 [13.01-37.10]	669 [624-719]	1.655	0.033	0.1
Diltiazem	Box-Cox-Probit	-2.83	0.13	0.372	11.09 [2.49-30.49]	375 [357-396]	64.28	0.030	5.8
Dodecylpyridinium-bromid	Box-Cox-Probit	-7.54	1.87	0.582	5.252 [3.843-6.867]	7.99 [7.49-8.40]	6.24	0.658	1.2
Ethacrynsäure	Box-Cox-Weibull	-1.02	1.20	-0.235	0.1035 [0.0455-0.1910]	1.79 [1.60-1.99]	0.176	0.058	1.7
Fusidinsäure	Box-Cox-Probit	-0.67	0.52	-0.020	0.0453 [0.0195-0.0880]	3.66 [3.16-4.22]	0.107	0.012	2.4
Metalaxyl	Weibull	-4.62	1.54		1.0305 [0.4804-2.1362]	586 [509-670]	9.962	0.002	9.7
Nalidixinsäure	Gen.Logit I	-8.21	128.5	0.042	0.1621 [0.1454-0.1807]	0.86 [0.84-0.89]	0.312	0.188	1.9
Streptomycin	Gen.Logit I	-24.76	22.28	0.110	0.1734 [0.1268-0.2301]	6.76 [6.30-7.13]	0.725	0.026	4.2

¹⁾ Siehe Abb. 6.1²⁾ In Klammern sind die unteren und oberen Grenzen des 95 % Konfidenzintervalles angegeben³⁾ DUNNET-Test, siehe Kapitel 6.3.1

Im Algentest zeigt Metalaxyl mit einer EC_{50} von rund 200 $\mu\text{mol/L}$ die geringste und Norflurazon mit einem EC_{50} von 0.02 $\mu\text{mol/L}$ die größte Toxizität. Im Bereich niedriger Effekte wird die größte Toxizität jedoch bei 8-Azaguanin beobachtet (EC_{01} 0.0005 $\mu\text{mol/L}$). Dies findet seine Erklärung in den unterschiedlichen Steigungen der Konzentrations-Wirkungskurven. 8-Azaguanin besitzt eine deutlich flachere Konzentrations-Wirkungskurve, als dies bei Norflurazon der Fall ist. Bei Norflurazon beträgt das Verhältnis EC_{01} zu EC_{50} 0.28 (Tabelle 8.3). Die EC_{50} liegt also lediglich etwa viermal höher als die EC_{01} . Bei 8-Azaguanin ergibt sich hingegen ein ganz anderes Bild. Hier liegt die EC_{50} mehr als 800mal über der EC_{01} . Aufgrund dieser stark unterschiedlichen Steigungen der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen ist die relative Toxizität der Stoffe zueinander abhängig von dem betrachteten Effektniveau.

Ein prinzipiell gleiches Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Toxizitäten der Mischungskomponenten des Leuchtbakterientestes. Die EC_{50} -Werte liegen zwischen 670 $\mu\text{mol/L}$ für Cycloserin und 0.07 $\mu\text{mol/L}$ für 8-Azaguanin.

Verwendet man das Verhältnis zwischen EC_{01} und EC_{50} als Maßzahl für die Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurve, so zeigt sich, daß die Konzentrations-Wirkungskurven der 14 Mischungskomponenten im Leuchtbakterientest durchschnittlich eine größere Steigung besitzen. Im Algentest wurde die steilste Konzentrations-Wirkungskurve bei Norflurazon beobachtet (EC_{01}/EC_{50} : 0.28), während im Leuchtbakterientest die größte Steigung bei Dodecylpyridiniumbromid mit einem Verhältnis EC_{01}/EC_{50} von 0.66 auftrat. Das heißt, die EC_{50} liegt um weniger als den Faktor 2 oberhalb der EC_{01} .

Die unterschiedliche Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven findet ihren Niederschlag in den unterschiedlichen Größen der Einzelstoffeffekte, die einer beobachteten Mischungstoxizität zugrunde liegen. Auch die Größe des nach dem Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT vorhergesagten Mischungseffektes hängt von der Steilheit der Einzelstoff-Konzentrations-Wirkungskurven ab. Dies wird in Abschnitt 8.4 ausführlich dargestellt.

NOEC's

Aus den in Kapitel 3.3 dargestellten Gründen wurden NOEC's für die Beantwortung der Frage nach dem Beitrag niedriger, allein nicht signifikanter Konzentrationen von Einzelstoffen zu einer Mischungstoxizität durch die EC_{01} operationalisiert. Dem Verhältnis zwischen der EC_{01} -Konzentration und der NOEC kommt deshalb besondere Bedeutung zu. Die Werte sind in den Tabellen 8.3 und 8.4 aufgeführt.

Dabei zeigt sich, daß die NOEC's aller untersuchten Stoffe oberhalb der jeweiligen EC_{01} liegen. Das Verhältnis beider Kenngrößen schwankt im Algentest zwischen 1.5 (Aclonifen) und 14.7 (8-Azaguanin). Im Leuchtbakterientest werden Verhältnisse zwischen 1.1 (Ampicillin) und 9.7 (Metalaxyl) beobachtet. Die Größe des Unterschiedes ist dabei abhängig von der Steigung der Konzentrations-Wirkungskurve zwischen EC_{01} und EC_{50} . Je steiler die Kurve, desto enger liegen NOEC und EC_{01} beieinander. Aufgrund der durchschnittlich steileren Konzentrations-Wirkungskurven der Einzelstoffe im Leuchtbak-

terientest ist auch das Verhältnis NOEC zu EC_{01} in diesem Test durchschnittlich etwas niedriger (arithmetisches Mittel 3.3) als im Algentest (arithmetisches Mittel 4.2).

8.3 Mischungstoxizität und Vorhersagbarkeit

Die Mischungstoxizität *unähnlich* wirkender Stoffe wurde auf Grundlage der in den Abbildungen 8.3 und 8.4 dargestellten Konzentrations-Wirkungskurven einerseits nach den Konzepten von UNABHÄNGIGER WIRKUNG und KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT kalkuliert und andererseits experimentell bestimmt. Durch den Vergleich von Vorhersage und Beobachtung wird Aufschluß über die Prognostizierbarkeit der Mischungstoxizität gewonnen.

In Abbildung 8.5 und 8.6 sind die experimentellen Ergebnisse der Gemischttestungen in beiden Biotests dargestellt. Wie schon bei der Einzelstofftestung sind die untersuchten Konzentrationen so gewählt, daß sich der gesamte Effektbereich beschreiben läßt. Auf die Darstellung der Konzentrationskurven der Gemische wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit an dieser Stelle verzichtet. Diese werden in Anhang D2 für jedes der vier analysierten Gemische dokumentiert, ausgewählte Effektkonzentrationen sind in Anhang E zusammengestellt.

Des weiteren sind in den Abbildungen die Prognosen der Mischungstoxizität nach den Konzepten von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG dargestellt. Für beide Konzepte wurden die Vorhersagen für den gesamten Effektbereich kalkuliert, so daß jeweils eine komplette Konzentrations-Wirkungskurve vorhergesagt wird.

Toxizität der Gemische

Wie in den Abbildungen dokumentiert, konnten für alle vier Gemische Daten in einer Qualität erhoben werden, die die Kalkulation einer Konzentrations-Wirkungsbeziehung erlauben (Anhang D2). Die daraus kalkulierten EC_{50} -Werte lagen im Algentest bei 25.1 $\mu\text{mol/L}$ (EC_{01} -Gemisch¹) bzw. 42.5 $\mu\text{mol/L}$ (EC_{50} -Gemisch). Die Toxizität der Gemische ist also kleiner als die des wirksamsten Einzelstoffes, aber größer als die der unwirksamsten Komponente. Gleiches gilt für die Gemische des Leuchtbakterientestes, in denen EC_{50} -Werte von 357.6 $\mu\text{mol/L}$ für das EC_{01} -Gemisch und 207.6 $\mu\text{mol/L}$ für das EC_{50} -Gemisch bestimmt wurden.

¹ Ein Gemisch, in dem die Komponenten im Verhältnis ihrer EC_{01} -Konzentrationen zusammengemischt wurden, wird im folgenden als *EC₀₁-Gemisch* bezeichnet. Analog dazu wird ein Gemisch, dessen Komponenten im Verhältnis ihrer EC_{50} -Werte zusammengesetzt werden, *EC₅₀-Gemisch* genannt.

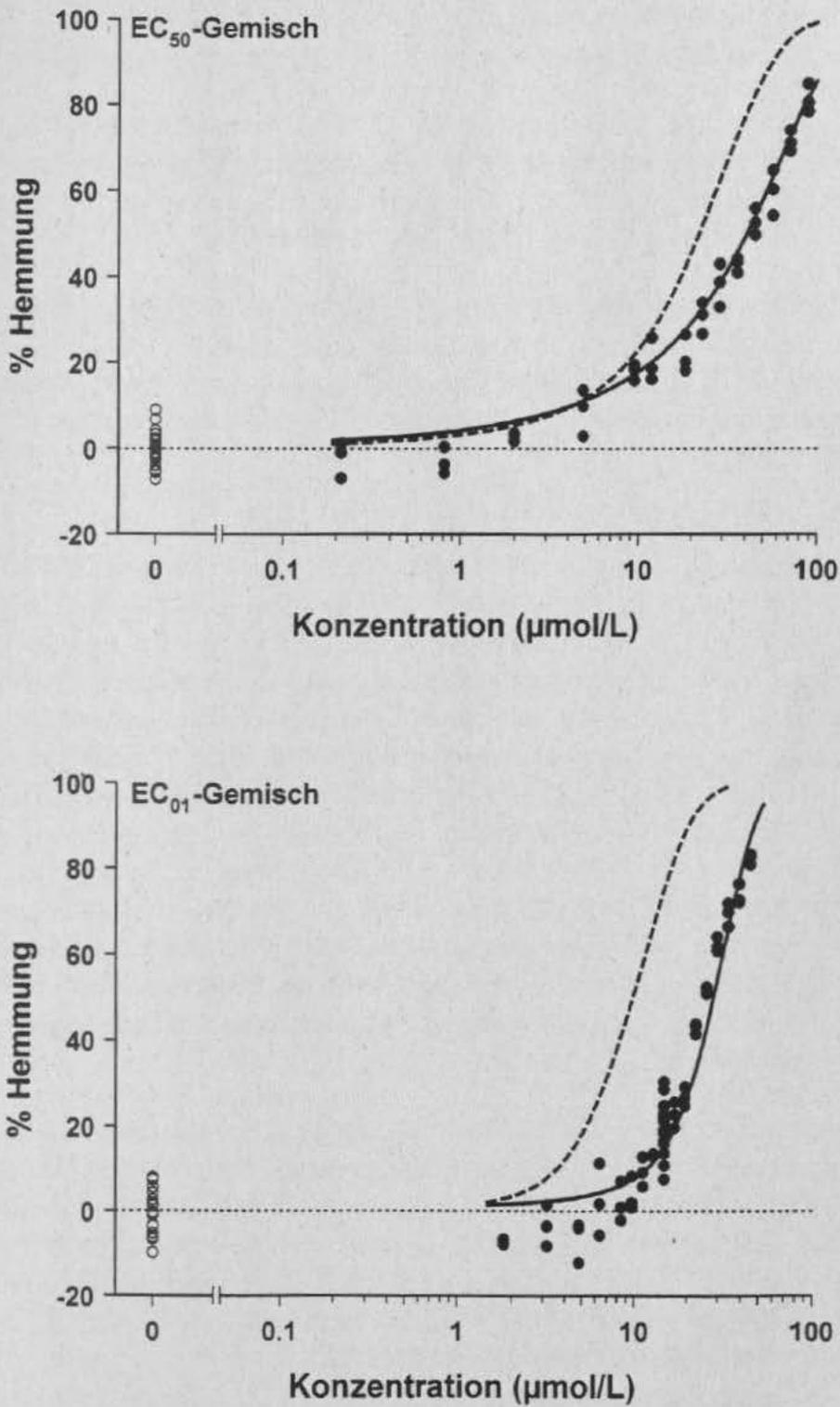


Abb. 8.5: Beobachtete und vorhergesagte Mischungstoxizitäten *unähnlich* wirkender Stoffe im Algentest

- Unbehandelte Kontrollen ● Behandelte Proben
- - - - Vorhersage nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT
- — — Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG

Die Unsicherheiten der Gemischttestungen sind denen der Einzelstofftestungen sehr ähnlich. Dies gilt sowohl für die Kontrollen, als auch für die Unsicherheiten, mit denen die Effektkonzentrationen bestimmt werden konnten. Beispielsweise liegt die Standardabweichung der Kontrollen im Falle des im Algentest analysierten EC₅₀-Gemisches bei

4.2 % Effekt, während sich im Durchschnitt der Einzelstofftestungen hier 4.4 % ergaben. Die Breite des 95 %-Konfidenzintervalles der EC₅₀ der Mischungskomponenten des Algentestes beträgt durchschnittlich 16.3 % der jeweiligen EC₅₀. In den Gemischen ergaben sich hier 5.4 % (EC₀₁-Gemisch) bzw. 11.9 % (EC₅₀-Gemisch).

Die Konzentrationsspanne zwischen 0 und 100 % Effekt ist im Falle derjenigen Gemische, die im Leuchtbakterientest analysiert wurden, kleiner als im Algentest. Dies wird insbesondere für die EC₀₁-Gemische deutlich. Diese größere Steigung ist ein Resultat der durchschnittlich größeren Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven der Einzelsubstanzen.

Vergleich der durch die Konzepte prognostizierten Toxizitäten

Wie in den Abbildungen klar zu sehen, prognostizieren die Konzepte unterschiedliche Toxizitäten, wobei KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT stets höhere Toxizitäten vorhersagt. Die Größe der Unterschiede in den Vorhersagen ist dabei abhängig vom Verhältnis, in dem die Komponenten zusammengemischt wurden. In beiden Biotests ist zu sehen, daß die Unterschiede in den Prognosen im Falle der EC₀₁-Gemische größer sind, als in den EC₅₀-Gemischen. Dies wird besonders im Leuchtbakterientest deutlich. So wird beispielsweise für das EC₅₀-Gemisch durch KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT eine EC₉₀ von 371.4 µmol/L vorhergesagt. Für diese Konzentration sagt das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG etwa 67 % Effekt vorher - ein Unterschied von nur 23 %. Anders im Falle des EC₀₁-Gemisches. Hier prognostiziert KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT eine EC₉₀ von 242.0 µmol/L. An dieser Stelle beträgt die Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG lediglich knapp 10 % Effekt. Eine Differenz von über 80 %. Auf der Ebene von Effekten ergeben sich bei bestimmten Konzentrationen und Mischungsverhältnissen also besonders große Unterschiede der Prognosen.

Beim Vergleich auf der Ebene von Effektkonzentrationen zeigt sich ebenfalls der Einfluß des Mischungsverhältnisses. Im Falle des EC₅₀-Gemisches liegt zwischen den prognostizierten EC₅₀-Konzentrationen lediglich ein Faktor von 1.5 (KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT sagt für dieses Gemisch eine EC₅₀ von 150.1 µmol/L, UNABHÄNGIGE WIRKUNG eine EC₅₀ von 232.3 µmol/L vorher, siehe Anhang E). Für das EC₀₁-Gemisch beträgt der entsprechende Faktor 2.5 (EC₅₀ nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT: 149.2 µmol/L; nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG 368.2 µmol/L). Der maximale Unterschied zwischen den prognostizierten EC₅₀-Werten liegt bei knapp 3 und wurde für das EC₀₁-Gemisch des Algentestes gefunden. Bedenkt man, daß die EC₅₀-Werte der Einzelkomponenten um mehr als den Faktor 100 000 differieren, so sind die Unterschiede in den Vorhersagen der Effektkonzentrationen jedoch bei beiden Mischungsverhältnissen gleichermaßen als gering einzuschätzen.

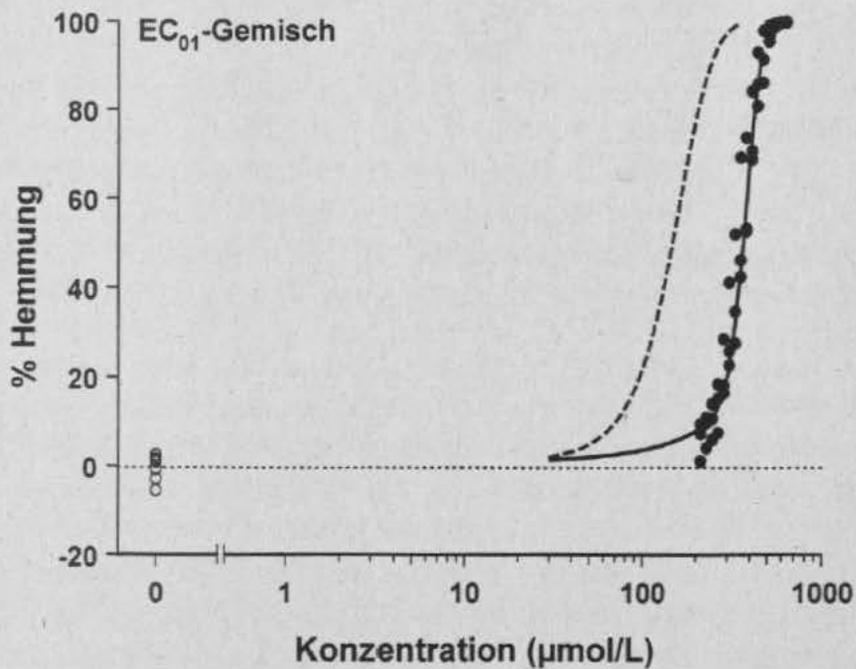
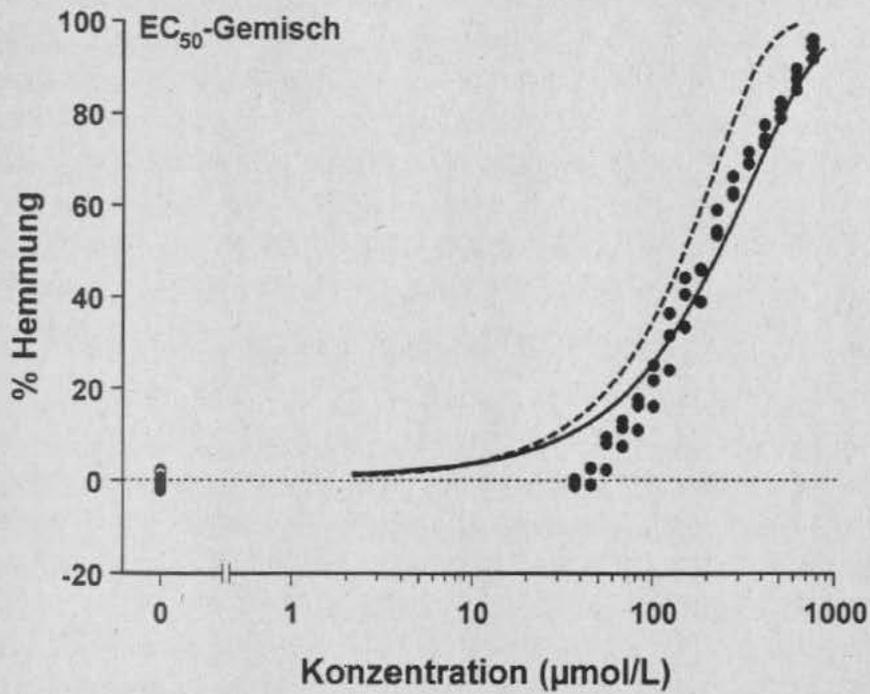


Abb. 8.6: Beobachtete und vorhergesagte Mischungstoxizitäten *unähnlich* wirkender Stoffe im Leuchtbakterientest

- Unbehandelte Kontrollen ● Behandelte Proben
- - - - Vorhersage nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT
- Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG

Vergleich vorhergesagter und beobachteter Mischungstoxizität

Vergleicht man die beobachteten Mischungstoxizitäten mit den Prognosen, so fällt die exzellente Übereinstimmung mit den Vorhersagen des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG ins Auge. Mit dem Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT lassen sich die experimentellen Daten hingegen offensichtlich nicht beschreiben. Dieses Konzept sagt höhere Mischungstoxizitäten vorher, als tatsächlich beobachtet wurden. Aufgrund der relativ geringen Unterschiede in den prognostizierten Effektkonzentrationen (s.o.) liefert das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT jedoch nicht vollkommen falsche Vorhersagen, sondern Näherungswerte, die je nach Fragestellung sogar ausreichend sein mögen.

Die hervorragende Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität durch das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG ist offensichtlich nicht abhängig von dem Verhältnis, in dem die Einzelstoffe zusammengesetzt werden. Sowohl bei den EC_{01} -Gemischen, als auch bei den EC_{50} -Gemischen sind keine nennenswerten Abweichungen zwischen Beobachtung und Vorhersage zu erkennen. Einzig im EC_{50} Gemisch, welches im Leuchtbakterientest analysiert wurde, ergeben sich kleinere Unterschiede zwischen den Beobachtungen und den Vorhersagen nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG. Diese treten jedoch nur in Bereichen kleiner Mischungseffekte (< 20 %) auf. Auch scheint die Prognosequalität kein Spezifikum eines bestimmten Biotestes oder eines spezifischen Gemisches zu sein. Genau wie im Leuchtbakterientest, ist auch im Algentest die Vorhersage des Konzeptes UNABHÄNGIGE WIRKUNG sehr gut.

Genauigkeit der Vorhersagen

Um Übereinstimmungen oder Abweichungen zwischen Beobachtung und Vorhersage quantitativ zu analysieren und auf statistische Signifikanz zu prüfen, wurde der *Index on Prediction Quality* (IPQ) verwendet. Zusammen mit seinen 95 %-Konfidenzintervallen ist er in Abbildung 8.7 und 8.8 für den Bereich von 10 % bis 90 % Effekt für alle vier untersuchten Gemische aufgetragen. Die numerischen Werte des IPQ für alle Gemische sind in den Tabellen des Anhanges E dokumentiert.

IPQ-Werte geben einen quantitativen Maßstab zur Beurteilung einer Abweichung zwischen der nach einem Konzept vorhergesagten Mischungstoxizität und den Beobachtungen. Dabei werden vorhergesagte und beobachtete Effektkonzentrationen verglichen. Ein IPQ bezieht sich deshalb immer auf eines der beiden Konzepte. Für jede beobachtete Effektkonzentration gibt es also zwei IPQ-Werte: den IPQ_{UW} , der die Abweichung zur Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG angibt, und den IPQ_{KA} , der ein Maß für die Abweichung zur Vorhersage nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT liefert. Da der IPQ Effektkonzentrationen vergleicht, kann er für definierte Effektkonzentrationen (z.B. EC_{50}) nur auf Grundlage einer biometrisch kalkulierten Konzentrations-Wirkungsbeziehung des Gemisches bestimmt werden.

Bei einem IPQ von Null stimmen die Beobachtungen exakt mit den Vorhersagen nach einem der beiden Konzepte überein. Ein IPQ kleiner als Null zeigt die Überschätzung der Mischungstoxizität durch das entsprechende Konzept. Liegt der IPQ über Null, so wird die

tatsächliche Toxizität durch das Konzept unterschätzt. Die genaue Definition des IPQ ist in Kapitel 6.3 zu finden.

Die IPQ-Analyse der vier getesteten Gemische aus Komponenten *unähnlicher* Wirkung unterstreicht den visuellen Eindruck der Abbildungen 8.5 und 8.6. Über den gesamten Bereich von 10 % bis 90 % Gesamteffekt sind keine deutlichen Abweichungen des IPQ_{UW} von Null festzustellen. Die Vorhersage der Mischungstoxizität durch das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG ist also außerordentlich exakt. Dabei sind keine Einflüsse des verwendeten Biotests, der spezifischen Mischungskomponenten oder des Mischungsverhältnisses festzustellen. Kleinere Abweichungen des IPQ_{UW} von der Nulllinie sind bei einigen Gemischen lediglich in Bereichen sehr großer oder sehr kleiner Mischungseffekte zu finden.

Ein ganz anderes Bild zeigt der IPQ_{KA} . Die Abweichungen von der Nulllinie sind bei allen Gemischen deutlich, die Werte des IPQ_{KA} liegen dabei immer unterhalb Null. Dieses Verhalten zeigt an, daß die durch das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT vorhergesagten Effektkonzentrationen kleiner sind, als diejenigen, die sich auf Grundlage der Konzentrations-Wirkungsanalyse des Gemisches ergeben. Das Konzept überschätzt also die Mischungstoxizität. Das Ausmaß der Überschätzung ist dabei abhängig vom Mischungsverhältnis der Einzelstoffe.

Da die Bestimmung sowohl der Einzelstoff-Toxizität als auch der Kombinationswirkungen mit geringen Unsicherheiten behaftet ist, ergeben sich relativ schmale 95 %-Konfidenzgürtel der IPQ-Werte beider Konzepte. Betrachtet man das EC_{01} -Gemisch des Algentestes in Abbildung 8.7 (B), so ist im Bereich von etwa 30 % bis 60 % Hemmung selbst eine Abweichung der Erwartung von der Beobachtung um einen Faktor von maximal 1.16 statistisch signifikant. Beispielsweise wurde eine EC_{30} des Gemisches bei $21.4 \mu\text{mol/L}$ nach dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG vorhergesagt. Demgegenüber steht ein tatsächlich beobachteter EC_{30} von $18.5 \mu\text{mol/L}$. Dieser Unterschied von nur etwa $3 \mu\text{mol/L}$ konnte mit dem verwendeten biometrischen und experimentellen Instrumentarium bereits als statistisch signifikant ausgewiesen werden.

Fallen jedoch Vorhersage und Erwartung derartig exakt aufeinander, wie dies für das EC_{01} -Gemisch des Leuchtbakterientestes der Fall ist (Abbildung 8.8 B), so läßt sich kein signifikanter Unterschied mehr feststellen. Der maximale IPQ_{UW} , der hier innerhalb des gesamten analysierten Effektbereiches von 10 % bis 90 % Mischungseffekt auftritt, beträgt nur 0.06. Das heißt, Beobachtung und Vorhersage nach dem Konzept von UNABHÄNGIGER WIRKUNG liegen an keiner Stelle um mehr als einen Faktor von 1.06 auseinander.

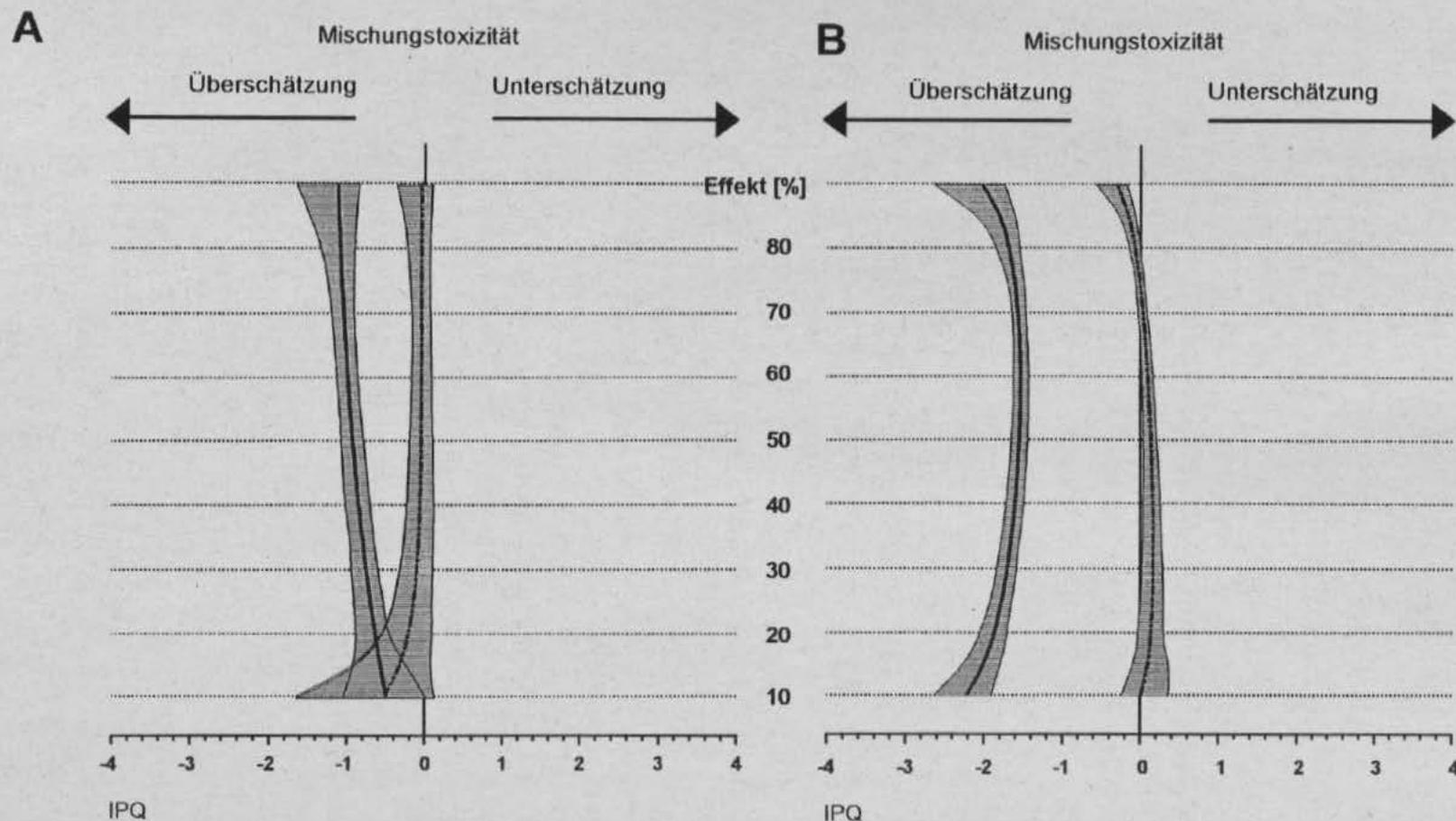


Abb. 8.7: IPQ-Analyse der Vorhersage-Genauigkeit für das Gemisch *unähnlicher* wirkender Stoffe im Algentest

————— Index on Prediction quality für das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT (IPQ_{KA})

- - - - - Index on Prediction quality für das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG (IPQ_{UW})

Der 95 %-Konfidenzbereich der IPQ-Werte ist als schraffierte Fläche dargestellt.

A: Komponenten wurden im Verhältnis der EC₅₀-Konzentrationen gemischt

B: Komponenten wurden im Verhältnis der EC₀₁-Konzentrationen gemischt

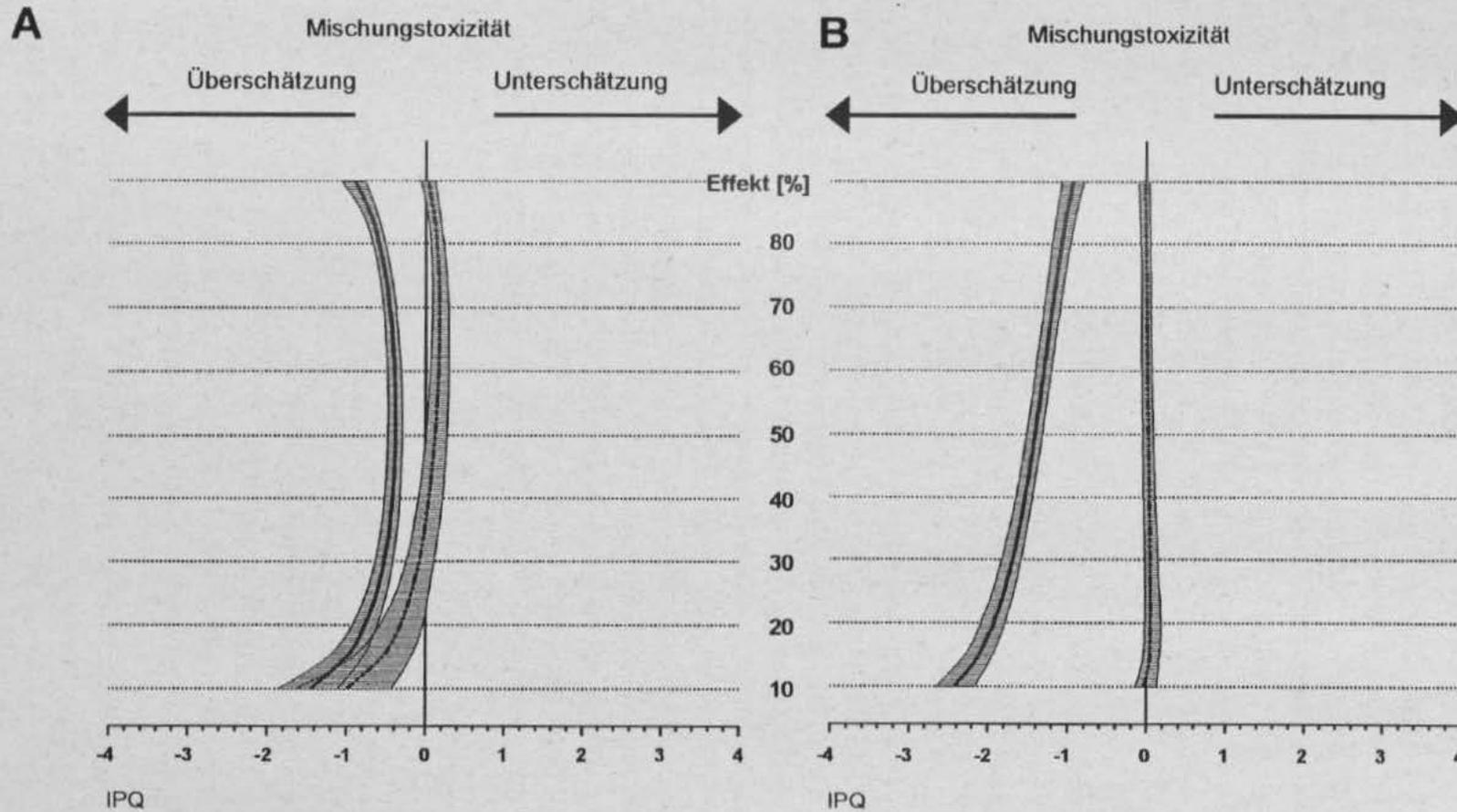


Abb. 8.8: IPQ-Analyse der Vorhersage-Genauigkeit für das Gemisch *unähnlicher* wirkender Stoffe im Leuchtbakterientest

————— *Index on Prediction quality* für das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT (IPQ_{KA})

- - - - - *Index on Prediction quality* für das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG (IPQ_{UW})

Der 95 %-Konfidenzbereich der *IPQ*-Werte ist als schraffierte Fläche dargestellt.

A: Komponenten wurden im Verhältnis der EC_{50} -Konzentrationen gemischt

B: Komponenten wurden im Verhältnis der EC_{01} -Konzentrationen gemischt

8.4 Beitrag niedriger Effektkonzentrationen

Um zu analysieren, ob niedrige, allein nicht signifikant wirksame Konzentrationen von Einzelstoffen zur Mischungstoxizität beitragen, wird die beobachtete Mischungstoxizität auf die zugrunde liegenden Einzelstoffeffekte reflektiert.

Bei einer gegebenen fixen Gesamtkonzentration des Gemisches sind aufgrund des bekannten Mischungsverhältnisses die Konzentrationen der beteiligten Einzelstoffe bekannt. Mit Hilfe der zuvor bestimmten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen lassen sich die Effekte kalkulieren, die diese Einzelstoffkonzentrationen auslösen würden, wenn sie allein auf den Organismus einwirken würden. Für die beiden analysierten Mischungsverhältnisse (EC_{50} bzw. EC_{01} der Komponenten) wurde diese Berechnung für je eine bestimmte Gesamtkonzentration des Gemisches durchgeführt. Für das EC_{50} -Gemisch wurde die Konzentration ausgewählt, für die das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT 50 % Effekt vorhersagt. Alle Mischungskomponenten liegen dann in Konzentrationen vor, die $1/N$ (N = Anzahl der Mischungskomponenten) der jeweiligen EC_{50} entsprechen. Im Falle des EC_{01} -Gemisches wurde die Analyse für diejenige Gesamtkonzentration durchgeführt, bei der alle Mischungskomponenten in Konzentrationen vorliegen, die rechnerisch 1 % Effekt auslösten, so sie allein präsent wären.

Für beide Biotests sind die Relationen zwischen Mischungstoxizität und Einzelstofftoxizität in den Abbildungen 8.9 und 8.10 dargestellt. Auf der jeweils linken Seite der Abbildungen sind die Einzelstoffeffekte aller Mischungskomponenten bei den entsprechenden Einzelstoffkonzentrationen aufgetragen. Auf der rechten Seite ist jeweils der bei der gegebenen Gesamtkonzentration beobachtete Effekt des Gemisches und die Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG zu sehen. Vergleicht man die beobachteten Mischungstoxizitäten mit den durch das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG vorhergesagten Effekten, so zeigt sich auch hier wieder eine exzellente Übereinstimmung. Die Abweichungen zwischen Vorhersage und Beobachtung betragen in allen vier untersuchten Fällen weniger als 4 %. Die Vorhersagen nach dem Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT überschätzen die Effekte des Gemisches hingegen deutlich.

EC₅₀-GEMISCHE

Für das im Algentest untersuchte EC_{50} -Gemisch (Abbildung 8.9 A) wird bei einer Gesamtkonzentration von 22.2 $\mu\text{mol/L}$ eine Hemmung von 29.3 % beobachtet, während das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG 31.5 % vorhersagt. Ein Unterschied von lediglich 2.2 %. Betrachtet man nun die Effekte, die sich aus den an dieser Stelle vorhandenen Einzelstoffkonzentrationen (die jeweils $1/16$ der individuellen EC_{50} entsprechen) ergeben, so liegen die Werte zwischen weniger als 1 % und etwa 10 % Hemmung.

Die Einzelstoffeffekte von 8-Azaguanin und Azaserin sind als signifikant einzustufen, da die Einzelstoffkonzentrationen oberhalb der entsprechenden NOEC's liegen. Für fünf Stoffe (Fenfuram, Metalaxyl, Metazachlor, Metsulfuron und Nalidixinsäure) ergeben sich

Einzelstoffkonzentrationen unterhalb der jeweiligen NOEC, denen Einzelstoffeffekte oberhalb 1 % zugeschrieben werden können. Für alle anderen Stoffe ergeben sich Einzelstoffeffekte unterhalb 1 %. Da sowohl die experimentelle Herangehensweise, als auch die biometrische Ermittlung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung auf Effektbereiche $\geq 1\%$ abgestimmt waren, sind diese Effekte aber nicht valide kalkulierbar.

Ein in den Grundzügen gleiches Bild ergibt sich auch bei der Untersuchung des EC_{50} -Gemisches im Leuchtbakterientest (Abbildung 8.10 A). Der Vergleich zwischen experimentell bestimmter Mischungstoxizität (35.9 % Hemmung) und nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG erwarteter Toxizität (35.8 %) zeigt wieder eine exzellente Übereinstimmung. Wie auch im Falle des Algentestes beobachtet, liegen die Einzelstoffeffekte zwischen deutlich weniger als 1 % und etwas über 10 %. 5-Fluoruracil, Fusidinsäure und Metalaxyl zeigen bei 1/14 ihrer EC_{50} -Konzentrationen signifikante Effekte.

Diese unterschiedlichen Einzelstoffeffekte der Mischungskomponenten sind die direkte Folge der unterschiedlichen Steigung der Konzentrations-Wirkungskurven. Der Effekt, den eine Konzentration auslöst, die 1/16 bzw. 1/14 der EC_{50} entspricht, ist eben bei steilem Kurvenverlauf schon nicht mehr bestimmbar, bei sehr flachen Kurven aber noch in einem Effektbereich, der signifikant von der Kontrollvariabilität abweicht. Es war jedoch die Frage zu klären, ob ein Gesamteffekt der Gemische zu beobachten ist, wenn alle Komponenten in Konzentrationen vorliegen, die allein keine statistisch signifikanten Effekte auslösen. Das EC_{50} -Gemisch erwies sich als ungeeignet, diese Frage eindeutig zu beantworten.

EC₀₁-GEMISCHE

Die Stoffkombinationen wurden in beiden Biotests deshalb auch im Verhältnis ihrer EC_{01} -Konzentrationen gemischt (Abbildung 8.9 B und 8.10 B). In diesem Fall löst das Testgemisch im Algentest 18.4 % Hemmung aus, wenn jede der 16 Komponenten in der Konzentration vorliegt, die allein (rechnerisch) 1 % Effekt bewirkt. Im Leuchtbakterientest führen die 14 Komponenten des Testgemisches in der gleichen Situation zu einem Gesamteffekt von 15.2 %. Diese Werte stimmen mit den Prognosen nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG überein (14.9 % im Algentest und 13.1 % im Leuchtbakterientest).

Die beobachteten Effekte dieser Testgemische sind bei der angegebenen Konzentration hoch signifikant (modifizierter t-Test, $p < 0.01$) von der Kontrollvariabilität unterscheidbar. Da gezeigt werden konnte, daß bei allen Mischungskomponenten die EC_{01} jeweils unterhalb der entsprechenden NOEC liegt, läßt sich also zusammenfassen, daß die Kombination von 14 bzw. 16 strikt *unähnlichen* Stoffen in Konzentrationen unterhalb ihrer NOEC's zu einem deutlichen Gesamteffekt des Gemisches führt.

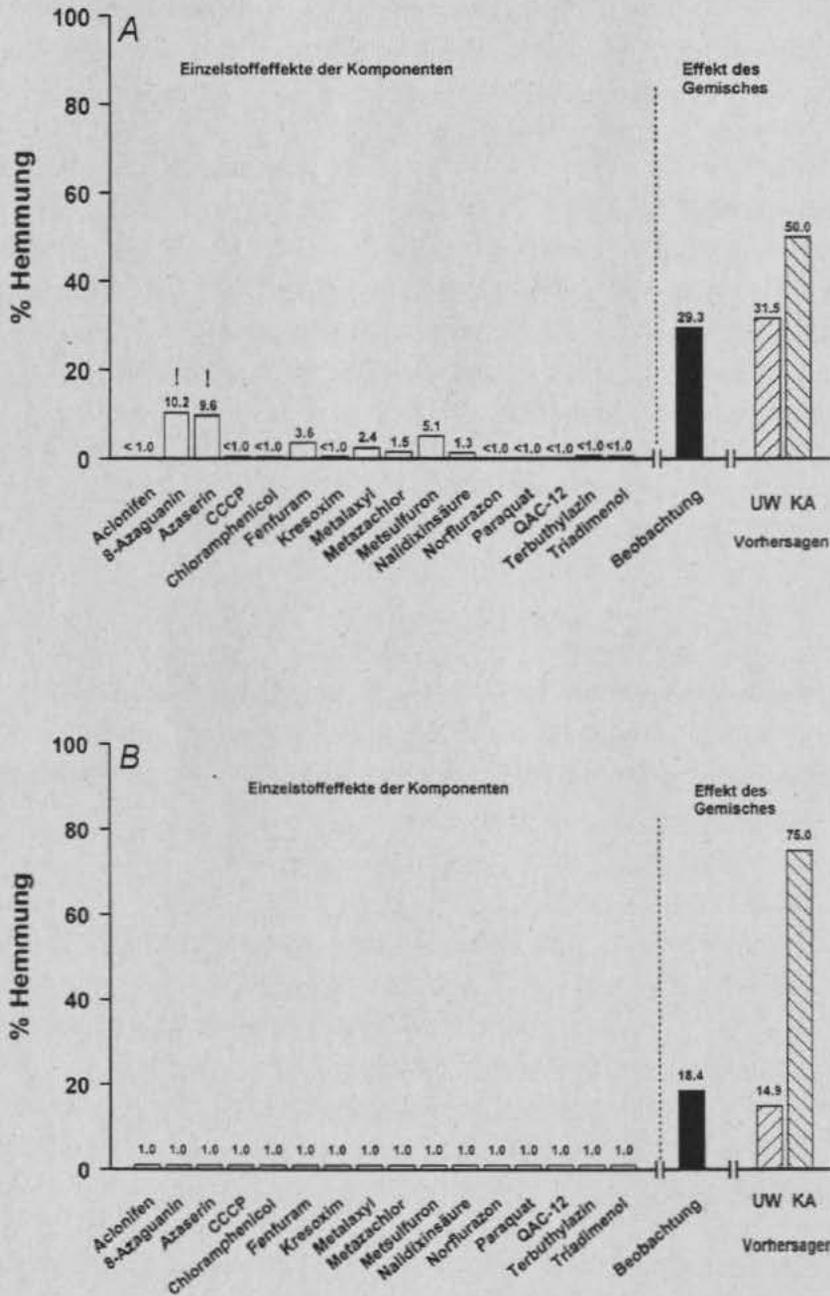


Abb. 8.9: Vergleich der Gesamteffekte von Gemischen mit den Effekten der einzelnen Komponenten: 16 *unähnlich* wirkende Mischungskomponenten im Algentest

- A** Mischungsverhältnis: EC_{50} der Einzelstoffe
 Einzelstoffkonzentration: jeweils $1/16$ der Einzelstoff- EC_{50}
 Gesamtkonzentration: $22.2 \mu\text{mol/L}$
- B** Mischungsverhältnis: EC_{01} der Einzelstoffe
 Einzelstoffkonzentration: jeweils Einzelstoff- EC_{01} ; Gesamtkonzentration: $14.8 \mu\text{mol/L}$
- UW nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagter Gesamteffekt des Gemisches
 KA nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT vorhergesagter Gesamteffekt des Gemisches
 ! Signifikante Effekte
 QAC-12 Dodecyltrimethylammoniumchlorid

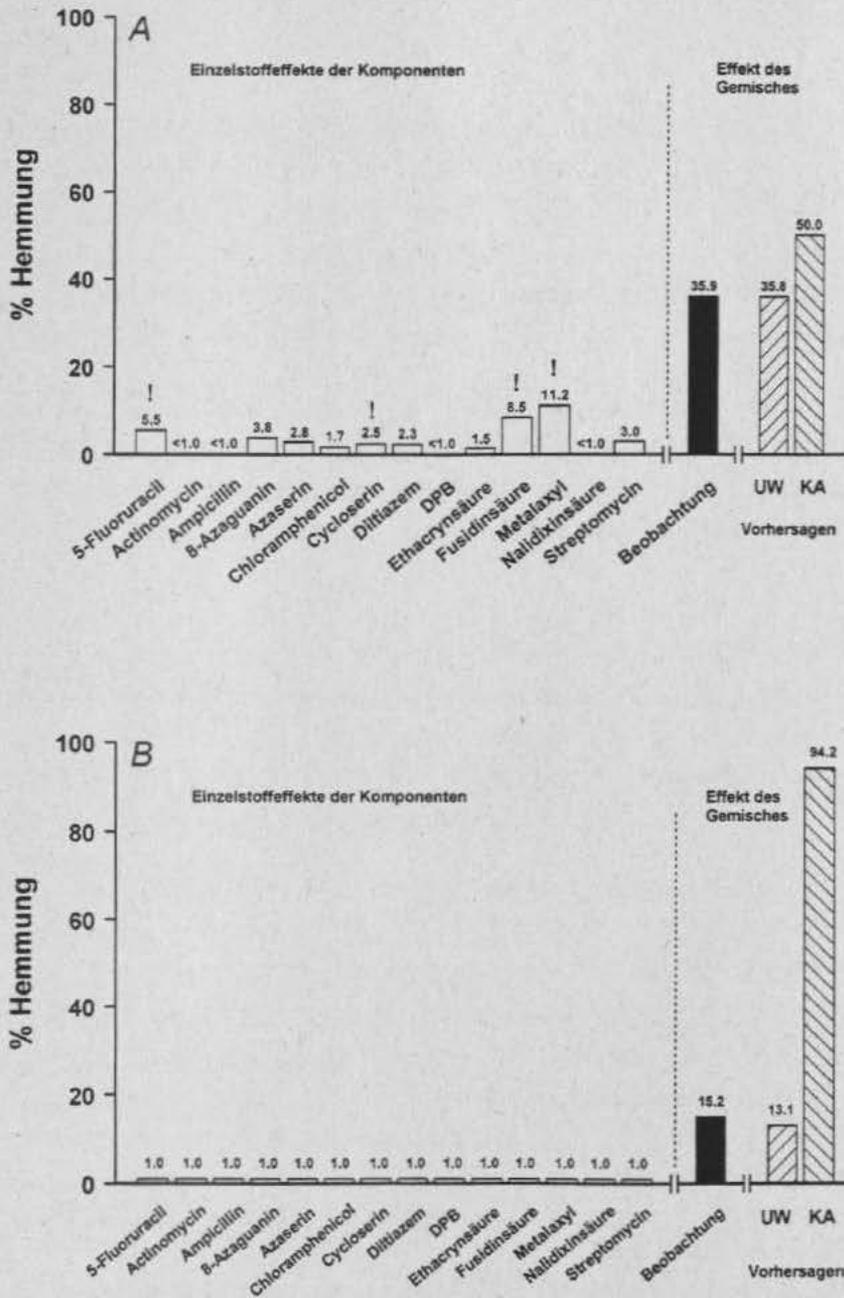


Abb. 8.10: Vergleich der Gesamteffekte von Gemischen mit den Effekten der einzelnen Komponenten: 14 *unähnlich* wirkende Mischungskomponenten im Leuchtbakterientest

- A** Mischungsverhältnis: EC₅₀ der Einzelstoffe
 Einzelstoffkonzentration: jeweils 1/14 der Einzelstoff-EC₅₀
 Gesamtkonzentration: 150.3 µmol/L
- B** Mischungsverhältnis: EC₀₁ der Einzelstoffe
 Einzelstoffkonzentration: jeweils Einzelstoff-EC₀₁; Gesamtkonzentration: 266.3 µmol/L
- UW nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagter Gesamteffekt des Gemisches
 KA nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT vorhergesagter Gesamteffekt des Gemisches
 ! Signifikante Effekte
 DPB Dodecylpyridiniumbromid

9 Fazit

Vorhersagbarkeit der Toxizität multipler Gemische

Die Toxizität der untersuchten multiplen Gemische hat sich sowohl im Algentest als auch im Leuchtbakterientest als vorhersagbar erwiesen. Dies gilt sowohl für Gemische aus *ähnlich* wirkenden Stoffen, als auch für Gemische aus *unähnlich* wirkenden Stoffen. Die Vorhersagbarkeit ist unabhängig davon, aus welchen speziellen Komponenten und in welchem Mischungsverhältnis die Gemische zusammengesetzt wurden. Sie ist zudem unabhängig vom geprüften Effektniveau.

Für die erzielbare Genauigkeit der Vorhersage spielt die Kenntnis der Wirkungsähnlichkeit bzw. -unähnlichkeit die ausschlaggebende Rolle. Die Toxizität von Gemischen aus *ähnlich* spezifisch wirkenden Komponenten wird durch das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT sehr genau vorhergesagt, während die Annahme UNABHÄNGIGER WIRKUNG zu einer Unterschätzung führt. Umgekehrt läßt sich die Toxizität *unähnlich* spezifisch wirkender Stoffe durch das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG sehr präzise prognostizieren. Dies wurde übereinstimmend für zwei unterschiedliche multiple Gemische mit 14 bzw. 16 Komponenten gezeigt. Die maximale Abweichung zwischen vorhergesagter und experimentell ermittelter EC_{50} betrug weniger als 12 %. Im Gegensatz dazu überschätzt KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT die Toxizität der Gemische *unähnlicher* Wirkung deutlich im gesamten Bereich zwischen 10 % und 90 % Effekt.

Exakte Prognosen sind also für Gemische *ähnlich* spezifisch wirkender Stoffe nur mit dem Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT, für Gemische *unähnlich* spezifisch wirkender Stoffe nur mit UNABHÄNGIGER WIRKUNG möglich. Die Fehleinschätzung von Effektkonzentrationen durch das jeweils andere Konzept sind allerdings nicht sehr groß. Die durch die Konzepte prognostizierten EC_{50} -Werte aller getesteten Gemische unterscheiden sich maximal um einen Faktor 3. Berücksichtigt man, daß KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT jeweils eine höhere Toxizität, d.h. niedrigere Effektkonzentrationen, vorher-sagt, liefert dieses Konzept in jedem Falle einen unter Vorsorgegesichtspunkten sicheren Näherungswert.

Beitrag niedriger Effekt-Konzentrationen

Situationen, in denen die Mischungskomponenten ausschließlich in niedrigen, allein nicht signifikant wirksamen Konzentrationen unterhalb der NOEC (EC_{01}) vorliegen, führen sowohl in den Testgemischen *ähnlich* wirkender, als auch *unähnlich* wirkender Stoffe zu einer deutlichen Toxizität des Gemisches. Dies wurde in beiden Biotests beobachtet.

10 Diskussion

Die in der Problemstellung aufgeworfenen Fragen (Abschnitt 2) wurden so fokussiert und operationalisiert, daß sie in exemplarisch angelegten Fällen experimentell bearbeitbar wurden (Abschnitt 4) und eindeutige Resultate erzielt werden konnten (Abschnitt 9). Die Diskussion führt nun von der Ebene spezifischer Testgemische und Testverfahren schrittweise zurück auf die allgemeinere Ebene der aquatischen Toxikologie. Sie erörtert Sicherheit, Verallgemeinerungsfähigkeit, Konsequenzen und Limitierungen der gewonnenen Aussagen und identifiziert offene Fragen.

Die Toxizität der multiplen Testgemische war mit den verwendeten Konzepten erstaunlich präzise vorhersagbar. Diese Prognosen bauen auf Analysen der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der einzelnen Komponenten. Deren Validität ist wegen der Tragweite der Resultate sicherzustellen. Abschnitt 10.1 prüft deshalb, ob es Indizien für modellabhängige Fehleinschätzungen gibt, oder ob das Ergebnis einer guten Vorhersagbarkeit aus biometrischer Sicht eindeutig ist.

Über die Angemessenheit des Konzeptes der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT für die Prognose der Toxizität von Gemischen *ähnlich* wirkender Stoffe besteht in der aquatischen Toxikologie bereits ein weitgehender Konsens (s. Abschnitt 3). In diesem Punkt liefern die Projektergebnisse einen klaren Beleg für die Richtigkeit bisheriger Annahmen. Neu ist jedoch der Befund, daß die Toxizität multipler Gemische aus Substanzen mit unterschiedlichen spezifischen Wirkungsmechanismen durch das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG eindeutig genauer vorhersagbar ist als durch KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT. Damit stellt sich die Frage, ob dieses Ergebnis nur für die untersuchten speziellen Gemische und Biotests Gültigkeit hat, oder ob tatsächlich ein regelhafter Zusammenhang angenommen werden kann. Abschnitt 10.2 prüft die Argumente und vergleicht die Projektergebnisse mit den Resultaten anderer Arbeiten.

Bisher vorliegende Arbeiten haben wiederholt den Schluß gezogen, daß KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT auch im Falle *unähnlich* wirkender Stoffe eine begründete Annahme darstelle und deshalb zur Grundlage regulativer Maßnahmen gemacht werden sollte (s. Abschnitt 3). Muß diese Schlußfolgerung auf Grund der Projektergebnisse nun zugunsten des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG revidiert werden, oder gibt es Argumente daran festzuhalten? Dieser Frage wird in Abschnitt 10.3 nachgegangen.

Mit der exemplarischen Realisierung von Gemischen strikt *ähnlich* und strikt *unähnlich* wirkender Stoffe und dem Nachweis der Prognostizierbarkeit ihrer Toxizität durch die korrespondierenden Konzepte von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG hat dieses Vorhaben wichtige Eckpfeiler geschaffen. In Gewässern vorfindbare Gemische werden sich nach Stand des Wissens in der Regel diesen Typen jedoch nicht oder zumindest nicht eindeutig zuordnen lassen. Abschnitt 10.4 erörtert deshalb die Fragen, wie Stoffe nach Wirkungs-Ähnlichkeit gruppiert werden können, und ob plausible

Annahmen formulierbar sind, die die Toxizität von Gemischen aus partiell oder eingeschränkt *ähnlich* wirkenden Stoffen zumindest näherungsweise prognostizieren lassen.

Aus dem Zusammenwirken vieler Schadstoffe kann ein deutlicher toxischer Gesamteffekt resultieren, auch wenn jeder Einzelstoff in einer Konzentration vorliegt, die alleine keinen signifikanten Effekt hervorruft. Abschnitt 10.5 stellt diesen für die gewässertoxikologische Risikobewertung besonders brisanten Teil der Projektergebnisse in den Kontext des Literaturstandes und erörtert die Konsequenzen.

Die Vorhersage-Konzepte der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG haben sich als überraschend genaue Instrumente der prospektiven Risikoabschätzung erwiesen. Damit wurde einerseits eine Ausgangsbasis für die Bearbeitung weiterer zentraler Fragen des Zusammenwirkens von Schadstoffen in aquatischen Systemen geschaffen, andererseits gibt es prinzipielle Limitierungen dieses Instrumentariums, zu deren Überwindung andere Wege gefunden werden müssen. Die Abschnitte 10.6 und 10.7 diskutieren diese Punkte.

10.1 Eindeutigkeit und Modellabhängigkeit

Vorhersagen der Toxizität eines Gemisches nach den Konzepten der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT bzw. der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG werden auf Grundlage von Effektkonzentrationen bzw. Effekten der im Gemisch vorliegenden Einzelsubstanzen kalkuliert. Diese Kennwerte zur Beschreibung der Einzelstoff-Toxizität wurden in diesem Vorhaben durch Regressionsmodelle geschätzt, die auf der Basis von experimentellen Beobachtungen eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung formulieren. Die mit einem Vorhersagekonzept erzielbare Vorhersagequalität einer Kombinationswirkung hängt somit unmittelbar von der Wahl des geeigneten Regressionsmodelles ab. Ist die Einzelstoff-Toxizität einer Gemischkomponente falsch modelliert worden, so wird auch die Vorhersage der Mischungstoxizität falsch berechnet. Rückschlüsse auf den Vorhersagewert des verwendeten Konzeptes werden dann ebenfalls falsch getroffen. Dies gilt erst recht für die Einschätzung der entsprechenden statistischen Unsicherheit und gewinnt besondere Bedeutung im Falle niedriger, statistisch nicht signifikant wirksamer Konzentrationsbereiche.

best fit Modell

Ist die Vorhersagbarkeit einer Mischungstoxizität somit modellabhängig? Keineswegs besteht eine Modellabhängigkeit in dem Sinne, daß die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der Einzelsubstanzen auf eine spezielle Art und Weise mathematisch formuliert werden müßten. Ob das Modell beispielsweise mit zwei oder drei Parametern operiert, ob Probit-, Logit-, Weibull- oder sonst welche Verteilungsfunktionen zugrundegelegt werden, ist prinzipiell gleichgültig. Gewährleistet sein muß nur, daß das gewählte Modell die Beobachtungsdaten valide beschreibt. Schlecht „sitzende“ Modelle führen zu zweifelhaften Ergebnissen. Das klingt einerseits trivial, begründet aber andererseits die oft übersehene Notwendigkeit der Einbeziehung statistischer Expertise in die Kombinations-Wir-

kungsanalyse. Nur in diesem Sinne kann von einer Modellabhängigkeit gesprochen werden.

In diesem Vorhaben wurde ein Regressionsmodell danach ausgewählt, daß es im Vergleich mit konkurrierenden Modellen anhand definierter Kriterien den beobachteten Konzentrations-Wirkungsverlauf am „besten“ beschreibt. Diese Vorgehensweise wurde unabhängig auf jede am Gemisch beteiligte Einzelsubstanz angewendet. Wird dieses *best fit* Modell durch ein anderes Regressionsmodell aus dem zur Verfügung stehenden Pool von 10 Modellen ausgetauscht, so muß die resultierende Vorhersage der Mischungstoxizität als weniger genau verworfen werden: Denn es sind nachweislich genauere Modellschätzungen möglich. Beschreibt das durch einen Vergleich ausgewählte *best fit* Modell die Beobachtungsdaten aber auch tatsächlich valide, und zwar unabhängig vom Effektniveau?

In diesem Vorhaben konnten alle beobachteten Konzentrations-Wirkungsdaten so modelliert werden, daß auf Grund der Residuenanalyse eine generelle Fehleinschätzung ausgeschlossen werden konnte. Der Pool vorhandener Regressionsmodelle erwies sich somit als ausreichend. Grundsätzlich ist aber bei *Black-Box*-Modellen nicht auszuschließen, daß sich auch Datensituationen ergeben können, die durch keines der hier verwendeten Regressionsmodelle valide beschreibbar sind. Diesem grundsätzlichen Problem kann erforderlichenfalls nur dadurch begegnet werden, daß noch flexiblere Anpassungsmodelle zugelassen oder komplexere (mechanistische) Modelle benutzt werden.

Um die Frage zu prüfen, ob möglicherweise systematische Fehleinschätzungen der Modelle in speziellen Effektbereichen vorliegen, die auf Grundlage einzelner Experimente nicht erkannt werden konnten, sind in Abbildung 10.1 die Abweichungen der durchschnittlichen Beobachtungen von der Modellschätzung (Residuen) von allen Einzelsubstanztestungen dargestellt. Hierbei sind jeweils die für eine Konzentration beobachteten Effekte über das arithmetische Mittel zu einer mittleren Beobachtung zusammengefaßt worden. Der Effektbereich umfaßt geschätzte Effekte von 1-90 %. Die Abweichung der Effektschätzung des entsprechenden *best fit* Modells vom beobachteten Effekt ist gegen die Effektskala aufgetragen. Als einfaches Beurteilungskriterium, ob eine vom Effektniveau abhängige generelle Modellabweichung von den Beobachtungsdaten und somit eine Fehleinschätzung vorliegt, ist zusätzlich eine nichtparametrische Splineglättung (vgl. 6.3) eingetragen, welche die mittlere Größe aller Residuen für jedes Effektniveau schätzt.

Zusammenfassend ergibt sich hieraus:

- Eine generelle Über- bzw. Unterschätzung ist nicht beobachtbar. Die größte durchschnittliche Verschätzung liegt im mittleren Effektbereich von 60-70% bei lediglich 1% Unterschätzung. Allerdings liegen in diesem Bereich auch bedeutend weniger experimentelle Daten vor.
- Im unteren Effektbereich sind Unter- oder Überschätzungen von Effekten gleichermaßen vertreten, eine tendenziöse einseitige Fehlschätzung ist nicht gegeben.
- Abweichungen des mittleren Beobachtungseffektes von der Modellschätzung betragen in 663 von insgesamt 794 Fällen weniger als $\pm 5\%$.

Weitere Detailanalysen ergaben, daß diese Aussagen generell für alle verwendeten Modelle und beide Testsysteme (Algen und Bakterien) gültig sind. Somit kann gefolgert werden, daß mit der eingesetzten Zahl von mindestens drei Replikaten je Konzentrationsstufe der durchschnittliche Effekt zwar nicht immer präzise über das *best fit* Modell wiedergegeben wird. Andererseits ist das Ausmaß dieser Fehleinschätzung in der Regel sehr minimal, nur auf einzelne Beobachtungen beschränkt, und führt zu keiner generellen Unter- bzw. Überschätzung.

Auswahlkriterium

Wie die Entscheidungskriterien für eine Modellauswahl aussehen müssen, richtet sich nach der Zielsetzung. Soll nur ein spezieller Effektbereich valide beschrieben werden oder der gesamte, inwieweit sollen Abbruchkriterien des iterativen Schätzverfahrens im Auswahlkriterium verwendet werden, und sind beobachtete Varianzinhomogenitäten in den Effekten zu berücksichtigen? Welche beobachteten Effekte sollen wie bewertet werden, wenn möglicherweise Outlier vorliegen? Ein Kriterium, welches diese Punkte alle beinhaltet, existiert bis dato nicht. Das in diesem Vorhaben verwendete SAE-Kriterium (vgl. 6.3) stellt eine Kompromißlösung zwischen der konventionellen Methode (Summe der Abweichungsquadrate) und einem Robustheitskriterium dar. Ein alternatives Aus-

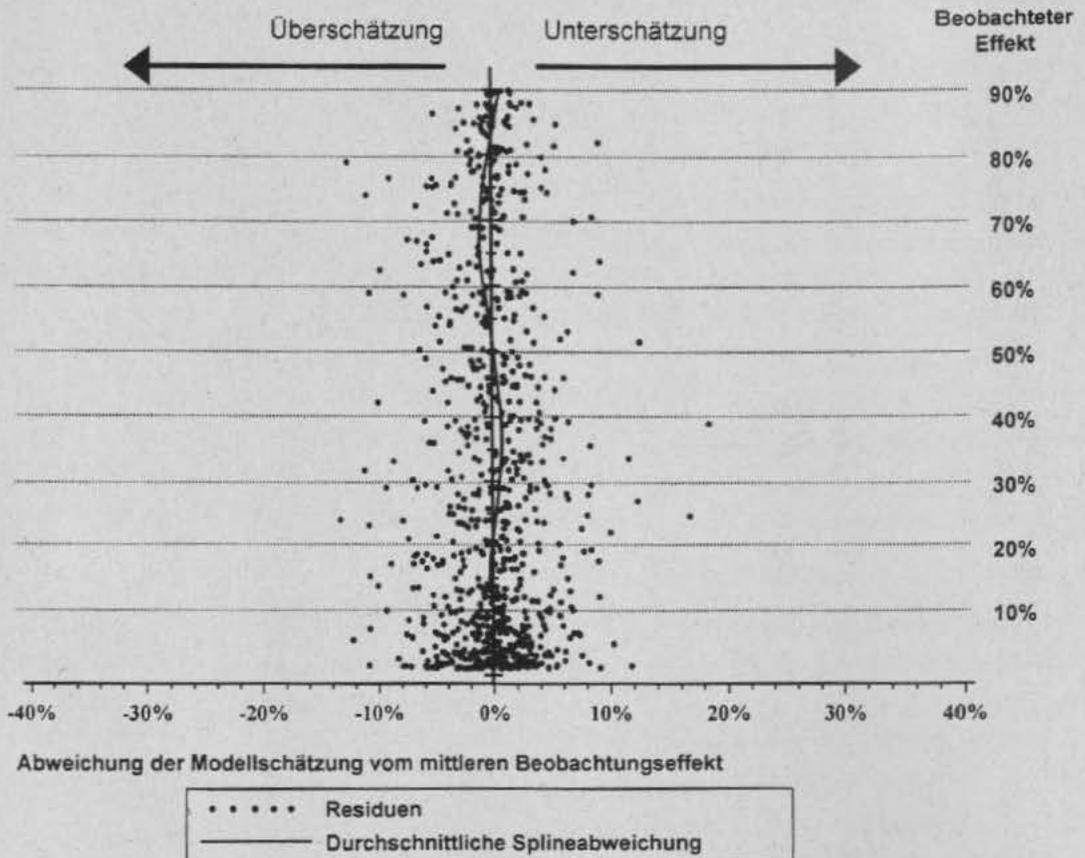


Abb. 10.1: Abweichung zwischen dem mittleren beobachteten Effekt und der Modellschätzung von allen getesteten Einzelsubstanzen

wahlkriterium kann zu einer alternativen Entscheidung bei der Wahl eines Regressionsmodells führen. Allerdings kann diese Situationen nur dann eintreten, wenn beide *best fit* Modelle sich überhaupt nicht oder nur marginal unterscheiden. Weitere grundlegende Arbeiten müssen in Zukunft zu diesem Problemfeld folgen, um den Begriff „beste Modellanpassung“ noch umfassender zu präzisieren.

Schätzverfahren

Um ein Regressionsmodell korrekt an die beobachteten Konzentrations-Wirkungsdaten anzupassen, muß überprüft werden, ob die notwendigen Voraussetzungen für eine korrekte Anwendung des verwendeten Schätzverfahrens erfüllt sind. Die in diesem Vorhaben verwendete verallgemeinerte Methode der Minimale-Quadrate-Schätzung kann nur dann zu erwartungstreuen Schätzungen führen, wenn die Beobachtungsdaten symmetrisch verteilt um die Modellerwartung sind. Sind die beobachteten Effekte einer beliebigen Konzentration normalverteilt, ist genau diese Voraussetzung erfüllt.

Im Rahmen der Toxizitätsprüfung des Gemisches ähnlich wirkender Substanzen (Entkoppler) im akuten Leuchtbakterientest (vgl. beobachtete Konzentrations-Wirkungsdaten im Anhang D2) wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen vielfach getestet (36 bzw. 45 Wiederholungen), so daß auf Grund dieser relativ großen Anzahl von beobachteten Effekten eine entsprechende Verteilungsanalyse möglich ist.

In Abbildung 10.2 sind diese entsprechenden Verteilungen über nichtparametrische Dichteschätzer dargestellt (Kernschätzung mit Normalverteilungskern, Parzen 1962). Die Gipfel dieser Verteilungen (bei ca. 47 % bzw. 55 % Hemmung) als Erwartungswerte können durch das arithmetische Mittel korrekt beschrieben werden. Eine grundsätzliche Asymmetrie in der Verteilung liegt in beiden Situationen nicht vor, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Voraussetzungen der gewählten Schätzmethode gegeben sind. Zur besseren Übersicht ist über den Verteilungen weiterhin ein *Box-Plot* dargestellt, dessen äußere Grenzen die Spannweite in den beobachteten Effekten angeben, die "Box"-Mitte den medianen Effekt und die Grenzen der Box das 25 %- bzw. 75 %-Perzentil beschreibt. Läge eine Nicht-Normalverteilung in den Effekten vor, so könnte auf varianzstabilisierende Methoden (Box und Cox 1964, Carroll und Ruppert 1988) oder geeignete Maximum-Likelihood-Verfahren (*Generalized Linear Models*, McCullagh und Nelder 1983) zurückgegriffen werden. Inwieweit alle verwendeten Regressionsmodelle dann noch einsetzbar sind, muß zukünftig überprüft werden.

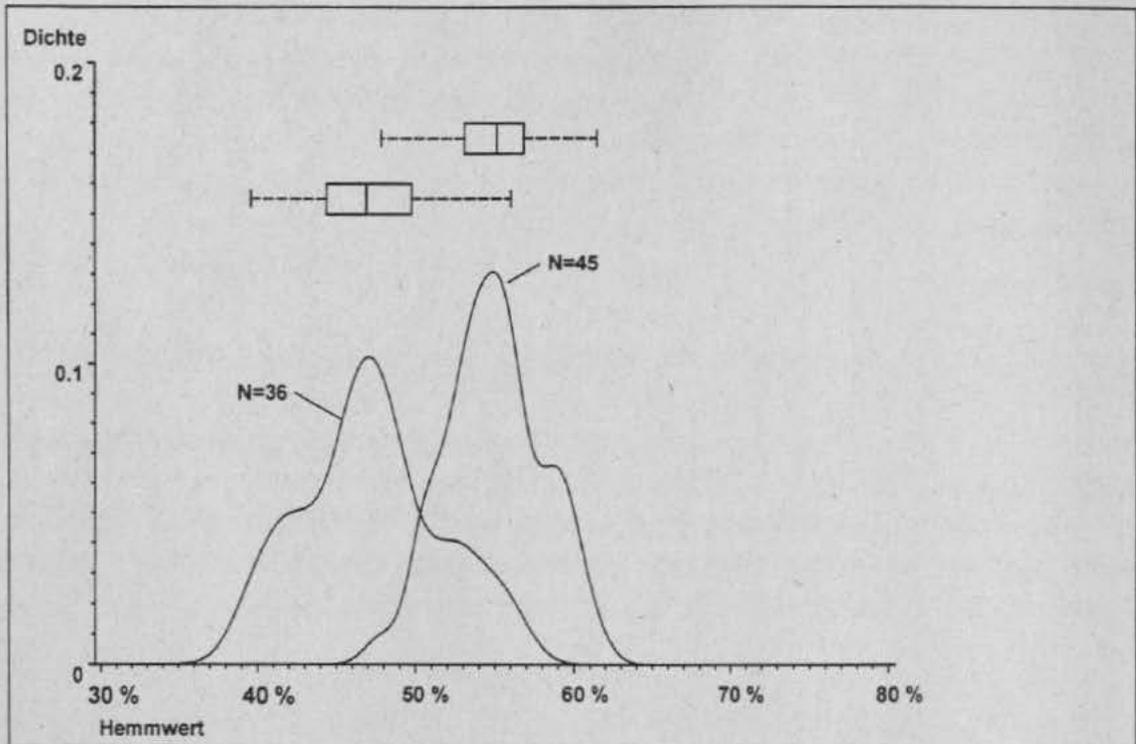


Abb. 10.2: Verteilung der beobachteten Effekte am Beispiel von zwei unterschiedlichen Gemischkonzentrationen im akuten Leuchtbakterientest

N = Anzahl der experimentellen Datenpunkte für die jeweilige Konzentration.

Die Spannweite zwischen dem 25 %- und 75 %-Perzentilwert (Grenzen der Box im *Box-Plot*) beträgt jeweils 5.4% (Median: 47 %) bzw. 3 % (Median: 55 %).

Fazit

Insgesamt konnten keinerlei Indizien dafür gefunden werden, daß irgendeine grobe Fehleinschätzung der beobachteten Konzentrations-Wirkungsbeziehung einer Einzelsubstanz vorliegt. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die Vorhersagen der Mischungstoxizitäten auf Basis des experimentellen Datenmaterials mit der verwendeten biometrischen Methodik nach bestem Stand der Wissenschaft valide bestimmt worden sind. Das Ergebnis einer guten Vorhersagbarkeit der Toxizität der multiplen Testgemische ist somit eindeutig.

10.2 Spezialfall oder Regelfall?

Die Toxizität multipler Gemische aus Stoffen mit identischem Wirkungsmechanismus ist mit dem Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT nahezu exakt vorhersagbar, während das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG zu deutlichen Fehleinschätzungen führt. Mit diesem experimentellen Ergebnis wurde die Richtigkeit bereits konsensfähiger Annahmen in unerwarteter Klarheit bestätigt. Nach Stand des Wissens (s. Abschnitt 3) kann davon

gesprochen werden, daß unzweifelhafte Referenzfälle geschaffen wurden, die ein konzentrations-additives Zusammenwirken von Schadstoffen in geradezu idealtypischer Weise repräsentieren.

Nicht bestätigt werden konnte hingegen die Hypothese, daß KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT so etwas wie die "General Solution" (Berenbaum 1985) der Kombinations-Wirkungsanalyse darstelle. Im Gegenteil, für zwei unterschiedliche multiple Gemische aus Stoffen mit unähnlichen spezifischen Wirkungsmechanismen konnte gezeigt werden, daß das konkurrierende Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG auch auf der Ebene integraler Effekte eine sehr genaue Prognose der Mischungstoxizität liefert, während KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT diese eindeutig überschätzt. Das Argument, daß die Vorstellung einer UNABHÄNGIGEN WIRKUNG von Mischungskomponenten auf der Ebene integraler Effekte in komplexen Systemen wie ganzen Zellen, Organismen oder Populationen von Organismen unangemessen sei (s. Abschnitt 3.1) verliert damit erheblich an Überzeugungskraft. Eine rein phänomenologische Sichtweise des Begriffes der Wirkungs-Ähnlichkeit (s. Abschnitt 3.4) erweist sich als nicht hinreichend tragfähig.

Damit stellt sich die Frage, ob möglicherweise Spezialfälle beobachtet wurden, die nur für die untersuchten Testgemische und Biotests relevant sind, oder aber ob dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG eine über diesen Rahmen hinausreichende Bedeutung zugemessen werden muß. Stellt UNABHÄNGIGE WIRKUNG neben KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT einen zweiten Eckpunkt dar, der bei der prognostischen Beurteilung von Kombinationseffekten in der aquatischen Toxikologie generell ins Kalkül gezogen werden muß und für den in diesem Vorhaben ebenfalls Referenzfälle realisiert wurden?

Projekt-immanente Argumente

Die präsentierte Studie wurde so konzipiert, daß sich Indizien für einen regelhaften Zusammenhang zwischen der Wirkungs-Ähnlichkeit oder -Unähnlichkeit von Mischungskomponenten und dem Prognosewert der korrespondierenden Vorhersage-Konzepte schon aus den Ergebnissen selbst ergeben (s. Abschnitt 5.1). Zwei Biotests mit Testorganismen unterschiedlicher Trophiestufen und Organismenreiche und mit unterschiedlichen Toxizitätsparametern kamen zum Einsatz. Der Typus unähnlicher Wirkung wurde mit unterschiedlichen Komponenten realisiert, die in jeweils zwei verschiedenen Mischungsverhältnissen kombiniert wurden. Physiko-chemische Interaktionen zwischen spezifischen Mischungskomponenten wurden nach Stand des Wissens soweit als möglich ausgeschlossen.

Im Ergebnis zeigen die Resultate ein völlig homogenes Bild. Das heißt, alle projekt-immanenten Anhaltspunkte sprechen dafür, daß dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG eine generelle Bedeutung für den Fall von Gemischen aus Umweltchemikalien mit unterschiedlichen spezifischen Wirkungsmechanismen zugesprochen werden kann.

Literaturstand zur multiplen Mischungstoxizität unähnlich wirkender Stoffe

Zur weiteren Abklärung ist der Stand der Literatur in Betracht zu ziehen. Dabei ergibt sich das Problem, daß nur eine einzige Arbeit vorliegt, die die Toxizität multipler Gemische

unähnlich wirkender Stoffe gegen Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG abgeglichen hat. Hermens und Leeuwangh (1982) stellten fest, daß die Fisch-Toxizität heterogener Gemische aus 8 oder 24 Komponenten zwischen beiden Vorhersagewerten lag. Andere in Abschnitt 3.5 referierte Arbeiten zur multiplen Mischungstoxizität *unähnlich* wirkender Chemikalien an Fischen und Daphnien haben nur die Vorhersagbarkeit nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT geprüft (Könemann 1981, Hermens, Leeuwangh und Musch 1985, Hermens et al. 1984b, Deneer, Seinen und Hermens 1988, Hamilton und Buhl 1990). Tendenziell ergeben sie das Bild mehr oder weniger deutlicher Überschätzungen durch KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT. Typischerweise wird von "*nahezu konzentrations-additiv*" gesprochen.

Alle diese Befunde widersprechen den Projektergebnissen nicht. Dazu sind folgende Gesichtspunkte in Rechnung zu stellen:

- Es wurden nur Überschätzungen der Mischungstoxizität durch KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT festgestellt, keine Unterschätzungen. Dies entspricht der typischen Relation zwischen den Vorhersagewerten nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG (s. Abschnitt 3.2).
- Wie in diesem Projekt gezeigt wurde, sind die quantitativen Differenzen zwischen den nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagten Effekt-Konzentrationen nicht sehr groß. "*Nahezu konzentrations-additiv*" kann deshalb durchaus bedeuten, daß UNABHÄNGIGE WIRKUNG eine genauere Prognose liefern würde.
- Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der Einzelstoffe im Bereich niedriger Effekte wurden nicht in der Weise bestimmt, wie dies für statistisch valide Kalkulationen von Vorhersagewerten nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG erforderlich ist. Insoweit diese Vorhersagen berechnet wurden, ist von einer erheblichen Unsicherheit auszugehen, und Abweichungen können auch rein methodisch bedingt sein.
- Dem Kriterium *unähnlicher* Wirkung wurde nicht mit solch strikten Anforderungen entsprochen wie in diesem Projekt. Auch unspezifisch wirkende Stoffe und *multi-site*-Inhibitoren waren in den Gemischen vertreten. Der Befund, daß die Toxizität zwischen den Vorhersagewerten nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG lag, scheint damit plausibel.

Vergleich mit binären Gemischen

Eine weitere Vergleichsmöglichkeit ergibt sich aus Arbeiten, die die Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität *unähnlich* wirkender Chemikalien an binären Gemischen geprüft haben. Die Vergleichssituation ist hierbei insofern günstiger, als Untersuchungen vorliegen, die darauf ausgelegt waren, den Vorhersagewert beider Konzepte, KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, zu prüfen. Zum einen können entsprechende Ergebnisse einer früheren Studie an Algen herangezogen werden (Grimme et al. 1994), Daten also, die sich auf den gleichen Biotest und die gleichen Toxizitätsparameter beziehen, wie ein Teil der Ergebnisse dieses Projektes. Zum anderen wurden in einem parallelen Kooperationsvorhaben des Landesumweltamtes Nordrhein-Westfalen Untersuchungen zur Vorhersagbarkeit der akuten und chronischen Daphnien-Toxizität binärer Gemische *unähnlicher* Wirkung durchgeführt. Somit kann nicht nur der Frage nachgegangen

werden, ob sich der Vorhersagewert des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG in binären Gemischen anders darstellt als in multiplen, sondern es kann gleichzeitig exemplarisch geprüft werden, ob die an einzelligen Organismen gewonnenen Resultate dieses Vorhabens prinzipiell auch auf höhere Organismen übertragbar sind.

Beide Studien werden in den nachfolgenden Abschnitten 10.2.1 und 10.2.2 im Detail erörtert. Insgesamt führt der Vergleich zu der Feststellung, daß sich die Ergebnisse zur Vorhersagbarkeit der Toxizität binärer Gemische strikt *unähnlich* wirkender Stoffe mit den Ergebnissen dieses Projektes insoweit decken, als im Regelfall keine niedrigere Toxizität beobachtet wird, als durch UNABHÄNGIGE WIRKUNG vorhergesagt. UNABHÄNGIGE WIRKUNG überschätzt die Mischungstoxizität nicht. Andererseits werden bei binären Gemischen relativ häufig Abweichungen in Richtung höherer Toxizitätswerte beobachtet, die durch KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT besser vorhergesagt werden. Relativierend ist jedoch in Betracht zu ziehen, daß die quantitativen Differenzen zwischen den Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG bei binären Gemischen in den dokumentierten Fällen noch geringer sind, als bei multiplen Gemischen. Ein Faktor 2 wird dabei nicht überschritten. Die tatsächliche Toxizität liegt in der Mehrzahl der Fälle innerhalb dieser geringen Spanne. UNABHÄNGIGE WIRKUNG erweist sich damit insgesamt als ein geeignetes Instrument zur Vorhersage der Mischungstoxizität *unähnlich* wirkender Stoffe. Es birgt allerdings das Risiko einer Unterschätzung der tatsächlichen Mischungstoxizität.

10.2.1 Binäre Gemische strikt unähnlicher Wirkung im Algentest

Für insgesamt 124 verschiedene binäre Gemische aus Pestiziden und Tensiden liegen Analysen der Vorhersagbarkeit der Toxizität vor (Grimme et al. 1994). Bei 14 dieser Gemische weisen die Komponenten jeweils eindeutig unterschiedliche, in Algen relevante spezifische Wirkungsmechanismen auf. Sie erfüllen also die gleichen Kriterien strikter Unähnlichkeit, wie die entsprechenden multiplen Testgemische, die in diesem Vorhaben geprüft wurden. Die Substanzen lagen im Gemisch im Verhältnis ihrer EC_{50} -Werte vor. Wie in diesem Vorhaben wurde die beobachtete Mischungstoxizität mit den Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG verglichen. Zur vergleichenden Analyse der Vorhersage-Genauigkeit wurden IPQ-Werte berechnet. Diese sind für die EC_{50} -Werte in Abb. 10.3 dargestellt. Zum Vergleich sind die entsprechenden Daten für das in diesem Vorhaben im Algentest geprüfte multiple Testgemisch unähnlicher Wirkung mit in die Graphik aufgenommen. Die binären Gemische sind nach der Höhe der IPQ-Werte für das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG angeordnet.

Für die in diesem Vorhaben geprüften multiplen Gemische weist das Balkendiagramm eine hohe Vorhersagegenauigkeit des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG aus (geringe IPQ-Beträge) und deutliche Überschätzungen durch das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT (relativ große negative IPQ-Werte). Im Vergleich erkennt man sofort, daß sich für die 14 binären Gemische insgesamt ein anderes Bild ergibt. Nur in zwei Fällen (Bentazon + Metazachlor und Chlortoluron + Metazachlor) weist das Konzept der

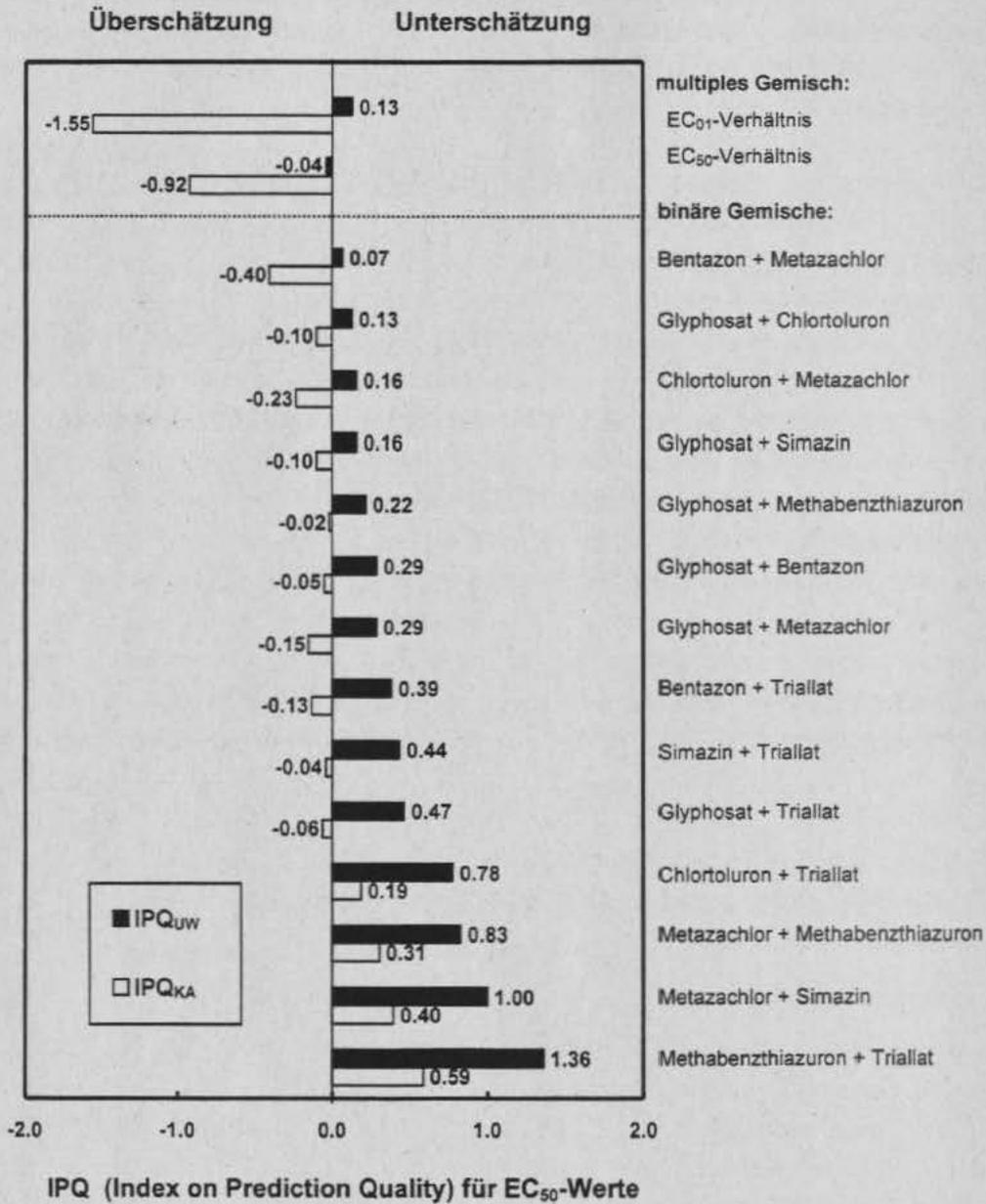


Abb. 10.3: IPQ-Analyse der Vorhersage-Genauigkeit für 14 binäre und ein multiples Gemisch *strikt unähnlich* wirkender Substanzen im Algentest

IPQ_{UW} IPQ für das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG

IPQ_{KA} IPQ für das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT

Die IPQ-Werte gelten für die vorhergesagten EC₅₀-Werte. Daten für die binären Gemische nach Grimme et al. 1994. Daten für das multiple Gemisch aus diesem Vorhaben (s. Abschnitt 8).

Wirkungsmechanismen der Komponenten:

Photosystem II Inhibitoren: Bentazon, Chlortoluron, Simazin, Methabenthiazuron

Lipidbiosynthese-Inhibitoren: Metazachlor, Triallat

Biosyntheseinhibitor aromatischer Aminosäuren: Glyphosat

UNABHÄNGIGEN WIRKUNG eine höhere Vorhersagegenauigkeit auf als KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT (kleinerer IPQ-Betrag). In allen anderen Fällen liefert KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT den genaueren Vorhersagewert.

Für alle 14 binären Gemische sagt KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT eine höhere Toxizität vorher als UNABHÄNGIGE WIRKUNG, d.h. kleinere EC_{50} -Werte. In allen 14 Fällen ist die beobachtete Toxizität größer als nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagt. In der Mehrzahl der Fälle (10 von 14) liegt sie innerhalb der Spanne zwischen beiden Vorhersagewerten. In 4 Fällen ist sogar noch etwas größer, als nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT vorhergesagt. Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen an multiplen Gemischen *unähnlich* wirkender Stoffe erweist sich UNABHÄNGIGE WIRKUNG für die geprüften binären Gemische also nicht als das besser geeignete Vorhersagekonzept. Vielmehr liefert es eine gute Abschätzung der minimalen Mischungstoxizität: die tatsächliche Toxizität ist nahezu gleich dem Vorhersagewert oder größer als dieser, aber in keinem Fall kleiner.

Bei diesem Vergleich binärer und multipler Gemische sind allerdings eine Reihe relativierender Gesichtspunkte in Betracht zu ziehen:

- Bei der Auswahl der Komponenten der binären Gemische waren andere Gesichtspunkte ausschlaggebend als in diesem Vorhaben. Sie erfüllen deshalb nicht die gleichen strengen Anforderungen an eine geringe Varianz der Konzentrations-Wirkungskurven, die Stabilität der Testkonzentrationen, die Konstanz der Testbedingungen und die Ausschließbarkeit indirekter Effekte. So wurden Triallat wegen seiner Flüchtigkeit, Glyphosat wegen hoher Varianz und Bentazon aufgrund der Erfordernis einer speziellen pH-Stabilisierung in diesem Vorhaben als ungeeignete Mischungskomponenten eingestuft. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß diese Faktoren bei einem Teil der Gemische zu Abweichungen von der Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG geführt haben.
- Da die Untersuchung der binären Gemische auf das Screening einer großen Zahl unterschiedlicher Kombinationen angelegt war, konnten an den Umfang des Datenmaterials für jede einzelne Konzentrations-Wirkungskurve nicht solch hohe Anforderungen gestellt werden, wie in diesem Vorhaben. Vorhersagen sind deshalb mit einer größeren Unsicherheit behaftet.
- Analysen der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der Einzel-Komponenten der binären Gemische wurden auf den Bereich zwischen 20 und 80 % Hemmung beschränkt. Bei sehr steilen Konzentrations-Wirkungskurven von Einzelstoffen kann die im Gemisch vorliegende Einzelstoff-Konzentration bei einer Gesamt-Toxizität des Gemisches von 50 % aber bereits kleiner als die EC_{20} sein. Dies führt dazu, daß die entsprechenden Vorsagenwerte nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG sehr unsicher werden.
- Die Differenzen zwischen den Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG sind für die geprüften binären Gemische sehr klein. Die nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagte EC_{50} ist nur 1.2 bis 1.6 mal größer als der nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT vorhergesagte Wert. Die Diskriminanz ist also sehr gering und eine eindeutige Zuordnung der beobachteten Toxizität zu einem der beiden Vorhersagekonzepte oft nicht möglich. Tatsächlich führten statistische Kriterien in 6 der 14 Fälle zu der Beurteilung, daß beide Konzepte Vorhersagen liefern, die nicht si-

gnifikant vom Beobachtungswert abweichen. Immerhin 6 Fälle wurden aber als signifikant von der Vorhersage UNABHÄNGIGER WIRKUNG abweichend und gleichzeitig übereinstimmend mit der Hypothese *konzentrations-additiver* Wirkung eingestuft. Ein Fall (Methabenzthiazuron + Triallat) mußte nach statistischer Datenanalyse sogar als eindeutiger Synergismus eingestuft werden, d.h. die Mischungstoxizität war signifikant größer als beide Vorhersagewerte.

Der Wert dieser 14 Datensätze liegt also nicht in der Unzweifelhaftigkeit jedes Einzelfalles, sondern darin, daß sie einen Trend aufzeigen. Dieser Trend geht eindeutig in Richtung einer Unterschätzung durch das Konzept UNABHÄNGIGER WIRKUNG. Ob dieser Trend ein Spezifikum binärer Gemische ist, darüber kann nur spekuliert werden. Für die Beurteilung des Vorhersagewertes des Konzeptes UNABHÄNGIGER WIRKUNG unter Vorsorgegesichtspunkten ist deshalb festzuhalten, daß das Konzept, wie in diesem Projekt gezeigt, für multiple Gemische aus Stoffen mit unterschiedlichen spezifischen Wirkungsmechanismen zwar deutlich genauere Vorhersagen liefern kann als KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT, daß aber andererseits auch das deutliche Risiko der Unterschätzung von Kombinations-Wirkungspotentialen besteht.

10.2.2 Akute und chronische Toxizität von Gemischen unähnlicher Wirkung im Daphnientest

Parallel zu diesem Vorhaben wurde in einem Kooperationsvorhaben¹ am Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen die Frage untersucht, ob und in welchem Maße Daphnien-Toxizitäten von Gemischen aus *unähnlich* wirkenden Substanzen unter Bedingungen akuter und chronischer Exposition über die Konzepte der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT oder der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG vorhergesagt werden können. Hierbei wurden 5 *unähnlich* wirkende Substanzen mehrfach in jeweils binären Kombinationen sowohl im Immobilisierungstest (48 h) als auch im Reproduktionstest (21 d) getestet, so daß ein Vergleich von akuter zu chronischer Mischungstoxizität möglich wurde. Die Testsubstanzen waren so gewählt, daß sie einerseits gewässertoxikologisch relevante Stoffgruppen und andererseits unterschiedliche Struktur- und Wirkungstypen repräsentierten.

Insgesamt zeigte sich hierbei, daß die Mischungstoxizität gut vorhersagbar ist. In neun von elf Fällen lieferte UNABHÄNGIGE WIRKUNG für den mittleren Effektbereich Prognosen, bei denen der maximale Fehler zum tatsächlichem Beobachtungswert durchschnittlich nur einem IPQ-Wert von ± 0.5 entsprach, d.h. es lag lediglich eine 1.5-fache Über- bzw. Unterschätzung vor. Mehrheitlich tendierten die Prognosen hierbei zu einer Unterschätzung der Mischungstoxizität. Allerdings zeigten sich Unterschiede in der Vorhersagegenauigkeit zwischen akuter und chronischer Mischungstoxizität, wenn vergleichend das Konzept

¹ F&E-Vorhaben „Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen - Binäre Kombinationen von unähnlich wirkenden Substanzen unter Bedingungen akuter und chronischer Exposition“, BMBF-Förderkennziffer 07 OTX 06 2

der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT als Vorhersagewert eingesetzt wurde. Dann erwiesen sich Vorhersagen auf Basis der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT im akuten Immobilisierungstest als teilweise präziser, während im Reproduktionstest generell eine bessere Vorhersagegenauigkeit der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG beobachtet wurde. Jeweils bei beiden Toxizitätsparametern konnten allerdings in Einzelfällen Ausnahmen einer synergistischen bzw. antagonistischen Kombinationswirkung beobachtet werden, bei denen die beobachtete Toxizität außerhalb der Spannbreite der beiden Vorhersagewerte der Konzepte lag.

Inwieweit ein in diesen Untersuchungen beobachteter Zusammenhang zwischen Vorhersagegenauigkeit und der Wahl des Toxizitätsparameters bzw. der Expositionsdauer tatsächlich gegeben ist, ist abschließend eindeutig nicht zu beantworten, da sich über unterschiedliche Effektparameter auch unterschiedliche Wirkungsmechanismen ergeben. Somit kann angezweifelt werden, ob die Substanzen das Kriterium strikt *unähnlicher* Wirkung im akuten wie im chronischen Test gleichermaßen erfüllen. Dies kann im noch unzureichenden Wissen über die substanzspezifischen Wirkungsmechanismen in Daphnien liegen.

In der Literatur wird die Frage, ob und inwieweit die Vorhersagbarkeit von Gemischen *unähnlicher* Wirkung von der Expositionsdauer bzw. vom Toxizitätsparameter abhängt, kontrovers diskutiert. Während die EIFAC (1987) die Eignung der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG zur Vorhersage der Mischungstoxizität unter chronischen Bedingungen generell anzweifelt, zeigen die vorstehend dargestellten Ergebnisse des Kooperationsvorhabens, daß gerade im Falle chronischer Toxizität UNABHÄNGIGE WIRKUNG für Gemische aus *unähnlich* wirkenden Stoffen einen guten Prognosewert besitzt. Arbeiten von Hermens et al. (1984b) stützen diesen Befund, auch wenn dabei nur KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT als Referenz betrachtet wurde. Für ein heterogenes 14-Stoffe-Gemisch¹ zeigten die Autoren, daß für die Reproduktionshemmung (16 d, EC₅₀) im Daphnientest eine geringere Mischungstoxizität beobachtet wird, als nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT prognostiziert (vgl. 3.5). Die dort bestimmte quantitative Abweichung zwischen beobachteter und vorhergesagter EC₅₀ entspricht einer ungefähr 2-fachen Überschätzung der Toxizität (IPQ-Wert: ca. -1). Das Gemisch gleicher Zusammensetzung zeigte hingegen beim Toxizitätsparameter Mortalität (48 h) eine deutlich konzentrations-additive Wirksamkeit. Erhärtet wurde der Befund nicht-konzentrations-additiven Zusammenwirkens im chronischen Test in einer ergänzenden Untersuchung (Deneer, Seinen und Hermens 1988) mit einem 9-Stoffe-Gemisch bei einem noch empfindlicheren Wachstumsparameter (16 d, EC₁₀ Längenwachstum).

In dem hier vorgestellten Projekt ergab sich eine sehr gute Vorhersage-Genauigkeit von UNABHÄNGIGER WIRKUNG für Gemische *unähnlicher* Wirkung. Wurde das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT als Grundlage für eine Prognose gewählt, so ergab sich für beide EC₅₀-Gemische jeweils eine 2-fache Überschätzung der Mischungstoxizität, oder in IPQ-Einheiten ausgedrückt ein Wert von -1. Diese Vorhersage-Genauigkeit ist aber identisch mit der von Hermens et al. (1984b) beobachteten. Somit kann eventuell davon aus-

¹ Die Substanzen wurden nach QSAR-Gesichtspunkten ausgewählt.

gegangen werden, daß die dort beobachtete Kombinationswirkung präziser nach dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG vorhersagbar gewesen wäre.

Insgesamt decken sich die Ergebnisse zur Toxizität von Gemischen *unähnlicher* Wirkung im Daphnientest mit den Ergebnissen binärer Kombinationen von Substanzen *unähnlicher* Wirkung im Algentest (10.2.1). Zu den in diesem Vorhaben an multiplen Gemischen erzielten Resultaten ergibt sich kein Widerspruch. Die Toxizität von Gemischen *unähnlicher* wirkender Substanzen ist durch das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG generell gut vorhersagbar. Im Einzelfall treten allerdings Abweichungen auf, die in der Regel eine Unterschätzung der Mischungstoxizität bedeuten. Dies gilt für sog. Mikrobiotests mit Einzellern ebenso wie für Tests an höheren aquatischen Organismen.

10.3 Vorhersagewert der Konzepte für Gemische aus Stoffen *unähnlicher* Wirkung

Als Ergebnis der vorstehenden Diskussion um die Frage der Verallgemeinerungsfähigkeit der gewonnenen Aussagen läßt sich also zusammenfassen, daß es keine Hinweise darauf gibt, daß die beobachteten Ergebnisse an die spezifischen experimentellen Bedingungen dieser Studie geknüpft sind. Vielmehr scheint die exakte Prognostizierbarkeit der Toxizität multipler Gemische aus spezifisch wirkenden Stoffen mit strikt unterschiedlichen Wirkungsmechanismen durch UNABHÄNGIGE WIRKUNG eine Regelhaftigkeit wiederzugeben. Zwar nimmt die Vorhersagegenauigkeit bei binären Gemischen leicht ab, doch dürfte dieser Typ von Gemischen für reale Umweltbedingungen weniger relevant sein.

Die Toxizität multipler Gemische strikt *unähnlicher* Wirkung läßt sich den Ergebnissen dieses Vorhabens zufolge sehr präzise nach dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG prognostizieren. Dieses Konzept ist jedoch in Bezug auf die zur Prognose notwendige Datenlage deutlich anspruchsvoller als das konkurrierende Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT, da UNABHÄNGIGE WIRKUNG auf Effektbasis operiert. Die Einzelstoffeffekte der Komponenten müssen für die im Gemisch vorliegenden Konzentrationen bekannt oder kalkulierbar sein. In der Regel bedeutet dies, daß die kompletten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bestimmt sein müssen. In typischen Situationen ist deshalb häufig eine Prognose von Mischungstoxizitäten durch das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG nicht möglich. Sind zum Beispiel die Konzentrationen mehrerer Stoffe in einem Gewässer bekannt und soll der erwartete Effekt dieses Gemisches nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG kalkuliert werden, so ist die alleinige Kenntnis toxikologischer Kenngrößen wie der EC_{50} nicht ausreichend. Mit Hilfe des Konzeptes der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT kann unter alleinigem Bezug auf die EC_{50} -Werte der Einzelstoffe hingegen immerhin bereits ein Erwartungswert für die EC_{50} des Gemisches kalkuliert werden. Somit wird ein Vergleich zwischen der prognostizierten EC_{50} des Gemisches und der im Gewässer gefundenen Konzentration möglich. Diese Prognostizierbarkeit ist unabhängig von der Anzahl der Mischungskomponenten. Im Falle des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG bedeuten große Anzahlen von Komponenten hingegen, daß zur Vorhersage einer gege-

benen Effektkonzentration immer niedrigere Effekte der Einzelstoffe in die Kalkulation eingehen müssen. Die Unsicherheit der Prognose steigt also.

Neben diesen praktischen Problemen der Umsetzung des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG zeigt sich, daß in binären Gemischen die mit diesem Konzept erzielbare Vorhersagegenauigkeit tendenziell abnimmt (siehe Abschnitt 10.2.1). Die beobachteten Abweichungen von der Prognose weisen dabei im Regelfall in Richtung einer höheren Toxizität. Das heißt, daß das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG die Gefahr einer Unterschätzung der Mischungstoxizität in sich birgt. Umgekehrt wird die Mischungstoxizität durch das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT im Einzelfall zwar möglicherweise überschätzt, was unter Vorsorgegesichtspunkten für regulatorische Maßnahmen allerdings unbedenklich ist. Im übrigen würde eine generelle Anwendung des Konzeptes der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT nach den vorliegenden Ergebnissen lediglich maximale Fehlschätzungen um den Faktor 3 bedeuten.

Zusammenfassend läßt sich also konstatieren, daß das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG für Gemische strikt *unähnlich* wirkender Stoffe zwar genauere Vorhersagen liefern kann als das konkurrierende Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT. KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT liefert allerdings immerhin gute Näherungswerte und bietet dabei die Vorteile leichter praktischer Umsetzbarkeit und geringerer Risiken von Toxizitäts-Unterschätzungen.

10.4 Ähnlichkeitskriterien und der Umgang mit Nicht-Wissen

Expositionssituationen in aquatischen Systemen sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen einer großen Anzahl chemisch heterogener Stoffen ausgesetzt sind. Sind die Wirkungsmechanismen dieser Stoffe bekannt, so kann das „passende“ Konzept ausgewählt werden und eine präzise Vorhersage der Mischungstoxizität getroffen werden. Diese Situation dürfte jedoch nur selten anzutreffen sein. Insbesondere deshalb, weil die Wirkungsmechanismen der betreffenden Stoffe in der Regel unbekannt sind. Somit mag es eine Forderung sein, die Wirkungsmechanismen von gewässerrelevanten Stoffen möglichst umfassend aufzuklären. Angesichts der riesigen Zahl in der Umwelt gefundener Chemikalien ist diese Aufgabe aber in absehbarer Zeit nicht lösbar.

Ein Ausweg kann darin gesucht werden, physiko-chemische Substanzparameter als Indizien der Wirkungsähnlichkeit heranzuziehen. Die Analyse des Zusammenhangs zwischen der Strukturähnlichkeit und der Wirkungsähnlichkeit von Stoffen mit Hilfe sogenannter (Q)SAR-Methoden (*Quantitative Structure Activity Relationships*) ist nur teilweise an biologische Testungen gebunden und eröffnet die Möglichkeit große Anzahlen von Substanzen in relativ kurzer Zeit klassifizieren zu können. Durch die Verwendung neuartiger Deskriptoren und Verfahren ist es möglich, auch strukturell heterogene Stoffe einem gleichen Wirkungsmechanismus zuzuordnen (Vighi et al. 1997). Die Tragfähigkeit dieses Ansatzes der Klassifizierung von Strukturähnlichkeiten als Indikatoren von Wirkungsähnlichkeiten für die Prognose von Kombinationswirkungen bleibt jedoch zu klären.

Selbst wenn die Wirkungsmechanismen oder Wirkungsweisen von Mischungskomponenten bekannt oder zumindest einschätzbar sind, so werden die resultierenden Gemische dennoch in den wenigsten Fällen einem der in diesem Projekt analysierten Referenzfälle *strikt ähnlicher* oder *strikt unähnlicher* Wirkung uneingeschränkt zuzuordnen sein. In der Regel werden Komponenten multiple Stoffgemische nur *partiell* oder *eingeschränkt* als *ähnlich* wirkend einstuftbar sein.

Gemische partiell ähnlicher Wirkung

Betrachtet man real in Gewässern vorkommende Gemische, wie sie sich aus Monitoring-Daten ergeben, so führt der Versuch einer Klassifizierung der Komponenten nach biologischer Wirkungs-Ähnlichkeit in der Regel dazu, daß mehrere Subgruppen *ähnlich* wirkender Stoffe gebildet werden können, diese gegeneinander aber als *unähnlich* abzugrenzen sind. Nach Stand des Wissens liegt der Gedanke nahe, daß eine möglichst genaue Prognostizierbarkeit der Toxizität solcher Gemische *partiell ähnlicher Wirkung* durch eine Verknüpfung der Vorhersagekonzepte von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG erreichbar sein müßte. Bislang fehlt es allerdings an einer tragfähigen theoretischen Basis für ein solches übergeordnetes Vorhersage-Konzept. Die vorhandene empirische Basis läßt jedoch die Annahme gerechtfertigt erscheinen, daß die Toxizität solcher Gemische im Regelfall höher ist, als nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagt, und niedriger als nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT prognostiziert. Für den Fall multipler Gemische wird diese Aussage insbesondere auch durch eine niederländische Studie gestützt (Hermens, Leeuwangh und Musch 1985), in der ein 33-Stoffe Gemisch bestehend aus 3 Subgruppen untersucht wurde (s. Abschnitt 3.5).

Gemische eingeschränkt ähnlicher Wirkung

Gewässerrelevanten Substanzen ist häufig ein spezifischer Wirkungsmechanismus nicht eindeutig zuzuschreiben. Es handelt sich entweder um sogenannte unspezifisch wirkende Stoffe (z.B. polare oder unpolare Narkotika oder grenzflächenaktive Substanzen) oder um sogenannte *multi site* Inhibitoren (z.B. Schwermetalle), oder es fehlt überhaupt jedes Wissen, daß eine Klassifizierung rechtfertigen würde. Eine Zuordnung zu den Vorhersagekonzepten von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG ist nur unter Zugrundelegung weniger strikter, nicht streng molekular definierter Begriffe von Wirkungs-Ähnlichkeit oder -Unähnlichkeit möglich. Der Versuch einer Klassifizierung solcher Gemische *eingeschränkt ähnlicher Wirkung* kann dann anhand physiologischer Wirkbilder unternommen werden. Ein Beispiel für eine solches Kriterium wäre das sogenannte FATS (*fish acute toxicity syndrome*), welches zur Identifikation von Stoffen mit einem sog. narkotischen Wirkungsmechanismus verwendet wurde (McKim, Schmieder, Carlson 1987). Nach Stand experimenteller Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, daß zumindest im Falle unspezifisch wirkender Substanzen für Gemische *eingeschränkt ähnlicher* Wirkung mit dem Konzept der Konzentrations-Additivität eine gute Prognostizierbarkeit erreicht wird. Die Klassifizierung von Stoffen nach physiologischer Kriterien *ähnlicher* Wirkungsweise ist allerdings an umfangreiche biologische Prüfungen gebunden und deshalb für viele Umweltchemikalien nach Stand des Wissens in einem absehbaren Zeitraum nicht umsetzbar.

Umgang mit Nicht-Wissen

Dieser ganzen Palette methodischer Schwierigkeiten bei der Klassifizierung von Stoffen als *ähnlich* oder *unähnlich* wirkend steht gegenüber, daß an einer Reihe binärer Gemische und einigen multiplen Gemischen gezeigt werden konnte, daß sich die Vorhersagen der Mischungstoxizität nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG nur graduell unterscheiden. Die Prognosen von Effektkonzentrationen der Gemische, die in dieser Studie analysiert wurden, differieren nur um maximal einen Faktor 3. Da die Differenzen zwischen den Prognosen durch die Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven von Einzelsubstanzen, die Anzahl der Mischungskomponenten sowie deren Mischungsverhältnis determiniert sind, gilt es in Simulationsstudien zu klären, ob solche geringen Dimensionen als regelhaft anzunehmen sind. Alle empirischen Befunde sprechen bisher dafür.

Die Notwendigkeit einer Beurteilung und Klassifizierung der Wirkungsähnlichkeit von Mischungskomponenten verliert damit für regulatorische Maßnahmen erheblich an Bedeutung. Damit steigen die Chancen eine konsensfähige vom Vorsorgeprinzip getragene Vorgehensweise dahingehend festzulegen, daß bei prospektiven Risikobewertungen dasjenige Vorhersage-Konzept herangezogen wird, welches die höhere Mischungstoxizität vorhersagt, also in der Regel KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT. Eine Aufgabe des Ähnlichkeitsvorbehaltes und die Annahme konzentrations-additiven Verhaltens auch für heterogene Stoffgemische kann somit in der aquatischen (Öko)toxikologie insgesamt als ein angemessenes Handeln unter Ungewißheit gerechtfertigt werden: "*better safe than sorry*".

10.5 Kombinationseffekte durch Einzelstoffkonzentrationen unterhalb der NOEC

In diesem Projekt konnte gezeigt werden, daß geringe allein nicht signifikant wirksame Konzentrationen (NOEC's) von Einzelsubstanzen in Kombination zu einer deutlichen Toxizität führen. Die gilt sowohl für Gemische aus *ähnlich* wirkenden Substanzen, als auch für Gemische *unähnlich* wirkender Komponenten. Diese Ergebnisse wurden gleichermaßen in beiden eingesetzten aquatischen Biotests jeweils unter Anlage strenger statistischer Maßstäbe bei der Signifikanzprüfung erzielt.

Seit der inzwischen fast 20 Jahre alten, aber gelegentlich noch zitierten Feststellung der EIFAC (1980), nach der Einzelstoffkonzentrationen, die ein Zehntel der jeweiligen EC_{50} nicht überschreiten, nicht mehr zur aquatischen Toxizität eines Gemisches beitragen, wurden eine Reihe von neueren Ergebnissen veröffentlicht (ausführliche Diskussion in Kap. 3.5). Diese Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle nochmals zusammengestellt. Der überwiegende Teil der Studien wurde mit *ähnlich* unspezifisch wirkenden Substanzen durchgeführt und führte zu dem Erkenntnisstand, daß insbesondere bei Stoffen mit vornehmlich narkotischen Wirkeigenschaften, auch Konzentrationen unterhalb einer NOEC zu einem Kombinationseffekt beitragen. Im Hinblick auf *ähnlich* spezifisch wir-

Tabelle 10.5.1: Einzelstoffkonzentrationen, die zu Kombinationseffekten führten

Studien (chronologisch)	Gemischkomponenten	
	ähnlich	unähnlich
Köneman 1980	0.02 × EC50	
Hermens & Leeuwangh 1982		0.1 × EC50
Hermens et al. 1984a	0.02 × EC50	
Broderius & Kahl 1985	$\frac{1}{21} \times LC50$	
Hermens et al. 1985b	NOEC	
Deneer 1988	0.0025 × EC50	
<i>dieses Vorhaben</i>	(0.05-1) × NOEC	(0.05-1) × NOEC

kende Stoffe lagen dagegen keine und für unähnliche Stoffe nur wenige Erkenntnisse vor. Diese Lücke konnte mit den Ergebnissen dieses Vorhabens geschlossen werden.

Die Problemstellung des Vorhabens aufgreifend kann also zusammenfassend geschlußfolgert werden, daß den Kombinationseffekten von Stoffkonzentrationen unter der jeweiligen NOEC bei der Beurteilung der Gefährdung aquatischer Lebensgemeinschaften und bei der Schadstoffregulierung Rechnung getragen werden muß.

Hierfür stehen grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Einerseits können die bekannten Kombinationswirkungskonzepte für eine prospektive Abschätzung von Kombinationseffekten niedriger Effektkonzentrationen von Einzelstoffen herangezogen werden und andererseits kann die Berücksichtigung von Kombinationseffekten durch zusätzliche Unsicherheitsfaktoren erfolgen.

Die Verwendung der Kombinationswirkungskonzepte für die Begrenzung einer gleichzeitigen Exposition gegenüber mehreren Schadstoffen ist bereits national und international in einer Vielzahl von Empfehlungen und Regelungen vorgesehen. Das Konzept der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT findet hierbei nahezu regelhaft Anwendung (vgl. Altenburger et al. 1993). Die Schwierigkeit, Umweltchemikalien oder Gefahrstoffe hinsichtlich ihrer Wirkungsähnlichkeit zu gruppieren, führte zudem dazu, daß gelegentlich die Anwendung des Additivitätskonzeptes nicht länger auf den Fall *ähnlicher* Stoffe begrenzt wurde (Grimme et al. 1994). Die Anwendung der Konzepte zur Abschätzung der Kombinationseffekte auch niedriger Stoffkonzentrationen ist - wie in diesem Projekt gezeigt werden konnte - mit keinerlei grundsätzlichen Schwierigkeiten behaftet. Zu prüfen wäre, ob „worst case“ Abschätzungen allgemein einer konzeptdifferentiellen Betrachtung überlegen sind, und welches Konzept den jeweiligen umweltpolitischen Rechtskonstrukten angemessen ist.

Unsicherheitsfaktoren kommt in der umweltoxikologischen Risikobewertung eine hohe Bedeutung zu. Die Vorgehensweise der derzeitigen Risikobewertungsverfahren besteht im wesentlichen darin, die Konzentration, mit der ein Stoff in der Umwelt voraussichtlich

vorkommen wird, mit derjenigen Konzentration des Stoffes zu vergleichen, bei der voraussichtlich noch keine biologische Wirkung auftreten wird. Unsicherheitsfaktoren dienen bei diesem Vorgehen einerseits dazu, unter Vorsorgegesichtspunkten Bewertungssituationen zu handhaben, in denen keine begründet quantifizierbaren Abschätzungen möglich sind, und andererseits dazu, Unsicherheiten der Extrapolation zu berücksichtigen, denen aber gewisse aus standardisierten Biotests gewonnene Erfahrungen zugrunde liegen. Letztere werden terminologisch auch als Extrapolationsfaktoren abgegrenzt (Kalberlah, Hassauer und Schneider 1997). Aufgrund der Ergebnisse dieses Vorhabens sowie auf der Basis des reichlich vorhandenen Datenmaterials in der Literatur könnte eine begründetere Ableitung der Extrapolationsfaktoren erfolgen.

In diesem Vorhaben wurden NOEC's aller Substanzen in Übereinstimmung mit den für Biotests empfohlenen Standardprozeduren ermittelt. Der experimentelle Aufwand war im Vergleich zu bestehenden Standards für Biotestverfahren zur Bestimmung von Toxizitätsparametern wesentlich erhöht (höhere Anzahl von Konzentrationsstufen und Kontrollen), so daß davon ausgegangen werden kann, daß eher niedrigere NOEC-Werte bestimmt wurden. Trotzdem lagen alle NOEC's aber mit einer einzigen Ausnahme deutlich über der zusätzlich bestimmten EC_{01} .

Grundsätzlich beruht die Bestimmung einer NOEC auf einer statistischen Testentscheidung mit dem Ziel, die Ausgangshypothese einer Übereinstimmung zwischen den Kontrollen und den beobachteten Effekten einer Konzentrationsstufe abzulehnen. Kann der Test diese Hypothese aber nicht ablehnen, so heißt das nur, das auf Grund der vorliegenden experimentellen Daten nicht entschieden werden kann, ob ein Effekt vorliegt oder nicht. Dies bedeutet aber nicht, daß tatsächlich kein Effekt vorliegt. Dieser Trugschluß wird jedoch leider häufig gezogen. Die NOEC wird als eine echte *No Effect Concentration* wahrgenommen. Auf dieses folgenschwere Mißverständnis ist wiederholt hingewiesen worden (Chapman et al. 1996, Noppert et al. 1994, Pack 1993, Moore und Caux 1997). Allein auf NOEC's basierenden Risikoabschätzungen sind damit beträchtliche Unterschätzungen eines toxischen Potentials immanent. Dies gilt für die Beurteilung von Kombinationseffekten um so mehr. Somit ist ein Ersatz der Bestimmung von NOEC's durch niedrige Effektkonzentrationen oder Benchmarks (vgl. Kap. 3.3) für die Berücksichtigung von Kombinationseffekten im Lichte der vorgelegten Ergebnisse unverzichtbar.

10.6 Grenzen der Vorhersagbarkeit

Komplexe Gemische

Eine Limitierung beider Vorhersage-Konzepte ist durch die Tatsache gegeben, daß alle Mischungskomponenten in ihrer Konzentration bekannt und toxikologisch charakterisiert sein müssen. Dies ist insbesondere bei sog. „komplexen Mischungen“, wie sie z.B. in Abwässern zu finden sind, von Bedeutung. Weder Anzahl noch Konzentration der Mischungskomponenten sind hier in der Regel bekannt. Außerdem ist von einer hohen zeitlichen Dynamik der Konzentrationen und der Anzahl vorhandener Stoffe auszugehen. Eine Beurteilung der von diesen Gemischen ausgehenden Toxizität ist demzufolge im Allgemeinen nicht auf Grundlage von Einzelstofftoxizitäten möglich, sondern wird nur durch direkte toxikologische Analysen des Gemisches zugänglich.

Interaktionen

Spezifische Interaktionen zwischen Mischungskomponenten werden von den Konzepten nicht berücksichtigt. Dazu gehören chemische Reaktionen der Komponenten untereinander, wie z.B. die Chelatisierung eines Schwermetalles durch einen Komplexbildner. Auch Veränderungen der Biotransformation einer Komponente (die zu einer Toxifizierung oder Detoxifizierung führt) durch die Anwesenheit einer zweiten Komponente können zu Abweichungen von den Vorhersagen führen. Gleiches gilt, wenn Rezeptoren erst durch die allosterische Bindung mehrerer Wirkstoffe inhibiert oder aktiviert werden. Durch alle diese Interaktionen können „echte“ Synergismen oder Antagonismen auftreten. Das heißt, die beobachtete Mischungstoxizität liegt deutlich höher oder niedriger als nach einem bestimmten Konzept vorhergesagt. Während möglicherweise auftretende Antagonismen unter Vorsorgegesichtspunkten in der aquatischen Toxikologie vernachlässigbar sind, gilt dies jedoch nicht für eventuelle Synergismen. Zwar scheinen solche Phänomene bei gewässerrelevanten Stoffen eher die Ausnahme als die Regel zu sein (Calamari und Vighi 1991), aber gerade aus dem Bereich der Herbizide und Insektizide sind eine Reihe von Synergismen bekannt und dokumentiert (Thompson 1996). Das Auftreten von Synergismen kann also nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Qualitative Wirkungsänderungen

Voraussetzung für jegliche Anwendung der Konzepte ist die Kenntnis der Einzelstoff-Toxizität der Mischungskomponenten. Je nach betrachtetem Konzept müssen entweder bestimmte Effektkonzentrationen oder Effekte der Komponenten valide bestimmbar sein. Zeigen jedoch ein oder mehrere Komponenten keine Toxizität, wenn sie allein appliziert werden, tragen aber dennoch zu einer Gesamtwirkung des Gemisches bei („coalitive effect“, bzw. „heterergic effect“, Loewe 1957), so ist keine Prognose der Mischungstoxizität möglich. Eventuell erlaubt der verwendete Meßparameter noch nicht einmal die Detektion eines erst in der Mischung neu auftretenden Effektes. Durch die Verwendung möglichst integraler Parameter wird zwar versucht, möglichst jede Beeinträchtigung des Testorganismus zu erkennen, aber es kann immer Effekte geben, die außerhalb der Betrachtung

tungsebene liegen. Im Algentest ist beispielsweise eine eventuell erst im Gemisch auftretende Mutagenität nicht zu detektieren. Gleiches gilt für den Leuchtbakterientest.

10.7 Offene Fragen und Forschungsbedarf

Experimenteller und biometrischer Aufwand

Der in diesem Vorhaben geleistete experimentelle und biometrische Aufwand war gerechtfertigt, um eindeutige Referenzfälle *ähnlicher* und *unähnlicher* Wirkung zu schaffen. Im Rahmen routinemäßiger Abschätzungen der Toxizität von Gemischen ist dieser Aufwand jedoch nicht zu leisten. Somit ist es erforderlich, eine Einschätzung darüber zu gewinnen, inwieweit durch eine Reduzierung des experimentellen und biometrischen Aufwandes die Prognosegenauigkeit verringert werden darf, ohne daß systematische Fehleinschätzungen auftreten. Aus statistischer Sicht bedeutet dies, das Verfahren wie Fallzahlkalkulationen (bzw. Power-Berechnungen im Falle der Verwendung statistischer Tests) erarbeitet werden müssen, um so eine bessere Grundlage für eine möglichst rationelle Versuchsplanung zu erhalten.

Fördereffekte

In diesem Vorhaben wurden die Gemischkomponenten für die Kombinations-Wirkungsanalyse von vorneherein so ausgewählt, daß nur gleichsinnige Effekte (Hemmungen) zu erwarten waren. Dies ist eine Grundvoraussetzung für die Anwendung des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG zur Berechnung der Vorhersage einer Mischungstoxizität. Dementsprechend waren die Regressionsmodelle für die Beschreibung der beobachteten Konzentrations-Wirkungsdaten ausgewählt worden. Allerdings werden in toxikologischen Tests von Schadstoffen in bestimmten Konzentrationsbereichen auch Effekte entgegengesetzter Richtung beobachtet (Fördereffekte, *Hormesis*). Für die Kombinations-Wirkungsanalyse stellen sich somit folgende Fragen:

- Kann der Gesamteffekt eines Gemisches auf Grundlage der Einzelstoffeffekte prognostiziert werden, wenn einige oder alle der Einzelstoffe in Konzentrationen vorliegen, die (einzeln appliziert) Fördereffekte verursachen?
- Sind die Konzepte der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG und KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT hierfür geeignet?
- Können die beobachteten Konzentrations-Wirkungsdaten auch regressionsanalytisch valide beschrieben werden¹ ?

Quantitative Unterscheidbarkeit der Prognosen beider Konzepte

In diesem Vorhaben zeigte sich, daß die quantitativen Unterschiede in den Vorhersagen einer Mischungstoxizität zwischen den konkurrierenden Konzepten der UNABHÄNGIGEN

¹ Bis dato ist in der Literatur nur ein Regressionsmodell (Van Ewijk und Hoekstra 1993, 1994) beschrieben, das einen kompletten Konzentrations-Wirkungsverlauf einschließlich einer *Hormesis* modellieren kann.

WIRKUNG und der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT wesentlich geringer ausfielen, als es im allgemeinen vermutet wird. Der maximale Abstand zwischen den Vorhersagewerten (Effektkonzentrationen) beider Konzepte lag lediglich bei einem Faktor 3. Diese Beobachtungen decken sich auch mit den in 10.2.1 diskutierten Ergebnissen für die Vorhersagen der Toxizität binärer Kombinationen. Es stellt sich deshalb die Frage, von welchen Bedingungen diese Diskriminanz abhängig ist, und ob sich dafür Regeln formulieren lassen.

Ähnlichkeit und Prognostizierbarkeit

Im Verlaufe dieses Projektes wurden Gemische aus *strikt ähnlich* bzw. *strikt unähnlich* wirkenden Stoffen untersucht. Damit wurde die Basis gelegt, um Gemische zu analysieren, die nicht strikten mechanistischen Ähnlichkeits- oder Unähnlichkeitskriterien genügen, dafür aber typischen Expositionssituationen in Gewässern näherkommen. Typisch sind chemisch heterogene Stoffe, denen entweder keine spezifische Wirkung zugeschrieben werden kann, oder deren Wirkungsweise und -mechanismen nicht bekannt sind. Somit gilt es zu klären, inwieweit sich die Toxizität solcher Gemische durch die Konzepte von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT oder UNABHÄNGIGER WIRKUNG beschreiben läßt.

Ähnlichkeitskriterien

Im vorgestellten Projekt wurde gezeigt, daß die genaue Vorhersage einer Mischungstoxizität von der Kenntnis der Wirkungsähnlichkeit bzw. -unähnlichkeit abhängig ist. Wirkungsmechanismen sind in vielen Fällen aber unbekannt. Die chemische Identität der Komponenten ist jedoch bekannt. Somit eröffnet die Verwendung chemisch-struktureller Deskriptoren und die darauf aufbauende Entwicklung quantitativer Struktur-Wirkungsbeziehungen Möglichkeiten zur Abschätzung der Wirkungsähnlichkeit. Die Entwicklung, Optimierung und experimentelle Validierung von Gruppenbildungskriterien, die auf der Grundlage chemisch-struktureller Parameter eine Einschätzung der Ähnlichkeit von Mischungskomponenten erlauben, ist demnach erforderlich.

Komplexe biologische Systeme

Im Mittelpunkt des hier präsentierten F&E-Vorhabens standen Fragen nach den Prognosefähigkeiten der Konzepte. Notwendigerweise wurden dabei eine Reihe von Operationalisierungen und Einschränkungen getroffen, die diese Fragen bearbeitbar machten. So wurden sämtliche toxikologischen Untersuchungen mit Biotesten an Einzellern auf organischer Ebene durchgeführt. Das heißt, es wurde die Toxizität an jeweils einer genetisch einheitlichen Population einzelliger Organismen einer Spezies bestimmt. Nach bisherigem Stand des Wissens ist davon auszugehen, daß auch bei Untersuchungen an höheren Organismen (z.B. Daphnien oder Fische) die gleiche gute Prognostizierbarkeit zu beobachten ist. Experimentelle Hinweise dafür wurden in Abschnitt 10.2.2 dargelegt. Der für aquatische Systeme weitaus relevantere Fall dürfte jedoch die Exposition mehrerer Populationen unterschiedlicher Spezies gleichzeitig sein. Somit treten Interaktionen, wie beispielsweise Räuber-Beute-Beziehungen, zwischen den verschiedenen Spezies auf. Ob und wie dies die Prognostizierbarkeit von Mischungstoxizitäten beeinflusst, ist bislang unklar.

Sequentielle Exposition

Die Konzepte von KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG gehen von einer gleichzeitigen Exposition der Testorganismen gegenüber den Schadstoffen aus. Die Situation in Gewässern ist jedoch durch eine hohe zeitliche Dynamik der Stoffkonzentrationen gekennzeichnet. Es erscheint demnach geboten, Konzepte für die Analyse der aus solchen „Schadstoffwellen“ potentiell resultierenden Kombinationswirkungen zu entwickeln.

11 Schlußfolgerungen und Konsequenzen

In Zusammenfassung der Ergebnisse beider Kooperationsvorhaben im Kontext des in Abschnitt 3 dargelegten Literaturstandes sowie der vorstehenden Diskussion ergeben sich aus diesem Vorhaben Schlußfolgerungen und Konsequenzen, die in 5 wesentliche Punkte gegliedert werden können:

- Aus der Belastung der Gewässer mit einer Vielzahl von Schadstoffen resultieren Gefährdungspotentiale, die mit der toxikologischen Prüfung von Einzelstoffen allein nicht erkannt werden. Der toxische Gesamteffekt eines Stoffgemisches ist im Regelfall größer, als der jeder Mischungskomponente allein. Auch wenn jeder Einzelstoff in einer Konzentration vorliegt, die im Experiment keinen signifikanten Effekt erkennen läßt, kann die Gesamtbelastung dennoch zu einem deutlich meßbaren Schaden führen. Dieser Sachverhalt gilt für multiple Gemische aus *ähnlich* wirkenden Substanzen, wie auch für Gemische aus Substanzen mit *unähnlichen* Wirkungsmechanismen. Er ist für unterschiedliche Biotests und Toxizitätsparameter experimentell belegt und statistisch abgesichert. Regulatorische Maßnahmen zum Schutz der Gewässer müssen dieses Wissen um Kombinations-Wirkungspotentiale berücksichtigen. Bleibt man im Rahmen der derzeit praktizierten Risikobewertungsverfahren, ist insbesondere zu prüfen, inwieweit dem Kombinations-Wirkungspotential beim Setzen von Unsicherheitsfaktoren explizit Rechnung getragen werden sollte.
- Die Toxizität von Stoffgemischen ist auf der Grundlage von Toxizitätsdaten der Einzelstoffe mit Hilfe der Konzepte der KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT oder der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG im Regelfall in guter Näherung, unter bestimmten Bedingungen sogar praktisch exakt vorhersagbar. Dies gilt prinzipiell für jeden *integralen* Effektparameter, der auch durch die einzelnen Mischungskomponenten beeinträchtigt werden kann, unabhängig von Art, Anzahl und Mischungsverhältnis der Komponenten und unabhängig von der Art des Testorganismus und der Expositionsdauer. Gefährdungspotentiale durch das Zusammenwirken von Stoffen sind also nicht nur erkannt, sondern es stehen auch Instrumente für ihre quantitative Abschätzung zur Verfügung. In welcher Weise Risikobewertungsverfahren davon Gebrauch machen können und sollen, gilt es zu prüfen.
- Die Annahme, daß das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG auf der Ebene *integraler* Effektparameter, die an ganzen Organismen oder Populationen von Organismen bestimmt werden, unangemessen sei und deshalb für die aquatische Toxikologie allenfalls theoretisch interessant, aber nicht von praktischer Bedeutung, hat sich als nicht richtig erwiesen. Das Konzept liefert sehr präzise Prognosen der Toxizität multipler Gemische aus Stoffen mit unterschiedlichen spezifischen Wirkungsmechanismen. Für jedes der beiden Vorhersagekonzepte, KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, stehen nunmehr Referenzfälle multipler Gemische zur Verfügung. Sie stellen die mit diesen Konzepten verknüpften Vorstellungen *ähnlicher* bzw. *unähnlicher* Wirkung jeweils in idealtypischer Weise dar und zeigen, daß keinem der beiden

Konzepte die prognostische Bedeutung grundsätzlich abgesprochen werden kann. Damit sind wichtige Eckpunkte in einem Feld unterschiedlicher Formen von Wirkungs-Ähnlichkeit oder -Unähnlichkeit gesetzt worden, welche nach heutigem Stand des Wissens oft nur wenig präzise definiert werden können. Nach Stand der Datenlage scheint es eine plausible Annahme, davon auszugehen, daß die Toxizität von Gemischen, die nur partiell oder eingeschränkt als *ähnlich wirkend* einstuftbar sind, im Regelfall innerhalb der Spanne liegt, die durch diese beiden Eckpunkte markiert wird.

- Die mit den Vorhersage-Konzepten verknüpfte kategorische Unterscheidung in *ähnlich* und *unähnlich* wirkende Stoffe erweckt leicht die Erwartung, daß die mit diesen Konzepten kalkulierten quantitativen Vorhersagewerte extrem unterschiedlich sein müßten und sich für ein gegebenes Gemisch wechselseitig als zutreffend oder nicht zutreffend ausschließen müßten. Theoretische Überlegungen und umfangreiche empirische Belege zeigen jedoch, daß dies im Regelfall nicht zutrifft. Die Spanne zwischen den durch die beiden Konzepte jeweils vorhergesagten Effekt-Konzentrationen ist meist relativ klein. Selbst bei den multiplen Testgemischen dieses Vorhabens mit 14 bis 18 Komponenten wurde ein Faktor 3 nicht überschritten. Bei einer großen Zahl binärer Gemische lag das Verhältnis zwischen den beiden Vorhersagen für die EC_{50} sogar nur zwischen 1.0 und 1.6. Die Kontroverse um die Frage, welches das richtige und möglicherweise universell gültige Konzept für die Prognose der Mischungstoxizität *unähnlich* wirkender Stoffe ist, verliert damit, zumindest im Hinblick auf regulative Maßnahmen, erheblich an Gewicht. Auch die Bedeutung der Debatte um die Frage nach den richtigen Kriterien für die Klassifizierung von Stoffen als *wirkungs-ähnlich* oder *-unähnlich* wird stark relativiert. Die umfangreichen empirischen Befunde "*nahezu konzentrations-additiver*" Mischungstoxizität *unähnlich* wirkender Stoffe erscheinen nicht mehr als vermeintlich fundamentaler Gegensatz zur Hypothese UNABHÄNGIGER WIRKUNG.
- Die Ergebnisse dieses Vorhabens haben UNABHÄNGIGE WIRKUNG als überlegenes Konzept für die Prognose der Mischungstoxizität von Stoffen ausgewiesen, die nach streng mechanistischer Definition *strikt unähnlich* wirken. Die reale Belastungssituation von Gewässern ist zwar durch Mischungen von Stoffen gekennzeichnet, die nicht als *strikt ähnlich* im rezeptor-theoretischen Sinne einstuftbar sind, dem Typus *strikt unähnlicher* Wirkung sind sie allerdings auch nicht eindeutig zuzuordnen (unspezifische Wirkungen, *multi site* Inhibitoren, fehlendes Wissen). Vorhersagen nach KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT liefern im Regelfall graduell niedrigere Effekt-Konzentrationen und bergen eine geringere Gefahr der Unterschätzung der Mischungstoxizität. Sie haben sich in vielen Untersuchungen als gute Näherungswerte für die Toxizität heterogener Stoffgemische erwiesen und lassen sich insbesondere für multiple Gemische mit niedrigen Einzelstoff-Konzentrationen sicherer kalkulieren und mit geringerem Aufwand überprüfen. Alles in allem genügend gute Gründe, nach wie vor für regulatorische Zwecke an der Empfehlung festzuhalten, KONZENTRATIONS-ADDITIVITÄT als "*reasonable worst case estimation*" für ein vorsorgendes Handeln unter Ungewißheit einzusetzen.

12 Literatur

- Alabaster JS, Calamari D, Dethlefsen V, Köneman H, Lloyd R, Solbé JF (1988) Water quality criteria for European freshwater fish. *Chemistry and Ecology* 3:165-253
- Alexander M, Estler C-J, Legler F (1995) *Antibiotika und Chemotherapeutika*. 2. Aufl., Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart
- Alho JM, Valtonen E (1995) Interval estimation of inverse dose-response. *Biometrics* 51:491-501
- Altenburg H-P (1994a) Fitting response curves for radioimmunoassays or immunoradiometric assays. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 32:873-880
- Altenburg H-P (1994b) On robust nonlinear regression methods estimating dose response relationships. *Proceedings in Computational Statistics* 11:239-244
- Altenburg H-P, Rosenkranz G (1990) Analysis of dose response data with SAS. In: Faulbaum F, Haux R, Joeckel K-H (eds) *Softstat '89: Fortschritte der Statistik-Software* 2. Gustav Fischer, Stuttgart, pp 183-190
- Altenburger R, Backhaus T, Segner H, Grimme LH, Schüürmann G (1997) Mixture toxicity testing of dissimilar acting compounds: Is the bioluminescence assay with *Vibrio fischeri* of any use? 7th Annual Meeting of SETAC-Europe, Amsterdam, The Netherlands. Abstract Book, p.85
- Altenburger R, Boedeker W, Faust M, Grimme LH (1990) Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals. Combination effect studies with pesticides in algal biotests. *Ecotoxicol Environ Saf* 20:98-114
- Altenburger R, Boedeker W, Faust M, Grimme LH (1993) Aquatic toxicology, Analysis of combination effects. In: Corn M (ed) *Handbook of hazardous materials*, pp 15-27. Academic Press, San Diego
- Altenburger R, Boedeker W, Faust M, Grimme LH (1996) Regulations for combined effects of pollutants: consequences from risk assessment in aquatic toxicology. *Food Chem Toxicol* 34:1155-1157
- Anderson PD, Weber LJ (1975) The toxicity to aquatic populations of mixtures containing certain heavy metals. *Proceedings of the International Conference on Heavy Metals in the Environment*, Toronto, Ontario, vol 2, pp 933-953
- Aranda-Ordaz FJ (1981) On two families of transformations to additivity for binary response data. *Biometrika* 68,2: 357-364 (Correction: *Biometrika* 39,1: 303)
- Ariens EJ, Van Rossum JM, Simonis AM (1956) A theoretical basis of molecular pharmacology. Part II. Interactions of one or two compounds with two interdependent receptor systems. *Arzneim-Forsch / Drug Res* 6:611-621
- Ashford JR (1981) General models for the joint action of mixtures of drugs. *Biometrics* 37:457-474
- Auterhoff H, Knabe J, Höltje H-D (1991) *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*. 12. Aufl., Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart
- Backhaus T, Froehner K, Altenburger R, Grimme LH (1997) Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: a comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay. *Chemosphere* 35:2925-2938
- Bates DM, Watts DG (1988) *Nonlinear regression. Analysis and its applications*. Wiley, New York
- Berenbaum MC (1981) Criteria for analysing interactions between biologically active agents. *Adv Cancer Res* 35:269-335
- Berenbaum MC (1985) The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J Theor Biol* 114:413-431
- Berenbaum MC (1989) What is synergy? *Pharmacol Rev* 41:93-141
- Berger BM, Wolfe NL (1996) Hydrolysis and biodegradation of sulfonylurea herbicides in aqueous buffers and anaerobic water-sediment systems: Assessing fate pathways using molecular descriptors. *Environ Toxicol Chem* 15:1500-07
- Bickel J, Krieger AM (1989) Confidence bands for a distribution function using the bootstrap. *JASA* 84:95-100

- Bieler GS, Williams RL (1993) Ratio estimates, the delta method, and quantal response tests for increased carcinogenicity. *Biometrics* 49:793-801
- Bliss CI (1939) The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol* 26:585-615
- Bödeker W, Altenburger R, Faust M, Grimme LH (1990) Methods for the assessment of mixtures of pesticides: mathematical analysis of combination effects in phytopharmacology and ecotoxicology. *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutzd (Braunschweig)* 42:70-78
- Bödeker W, Altenburger R, Faust M, Grimme LH (1992) Synopsis of concepts and models for the quantitative analysis of combination effects: from biometrics to ecotoxicology. *Archives of Complex Environmental Studies* 4(3):45-53
- Bödeker W, Drescher K, Altenburger R, Faust M, Grimme LH (1993) Combined effects of toxicants: The need and soundness of assessment approaches in ecotoxicology. *Sci Total Environ, Supplement*:931-939
- Bol J, Verhaar, HJM, Van Leeuwen CJ, Hermens JLM (1993) Predictions of the aquatic toxicity of high-production-volume-chemicals. Part A: Introduction and methodology. Part B: Predictions. *Publikatiereeks Stoffen, Veiligheid, Straling, Ministry of Housing, Physical Planning and Environment, The Hague, The Netherlands*
- Box GEP, Cox DR (1964) An analysis of transformations. *J R Stat Soc B* 26:211-246
- Box GEP, Tidwell PW (1962) Transformations of the independent variables. *Technometrics* 4:531-550
- Broderius S, Kahl M (1985) Acute toxicity of organic chemical mixtures to the fathead minnow. *Aquatic Toxicol* 6:307-322
- Bruce RD, Versteeg DJ (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ Toxicol Chem* 11:1485-1494
- Calamari D, Vighi M (1991) Scientific bases for the assessment of toxic potential of several chemical substances in combination at low level. Report prepared for the Scientific Advisory Committee on Toxicology and Ecotoxicology of the Commission of the European Community (EEC, contract B 6612-90-001297)
- Calamari D, Vighi M (1992) A proposal to define quality objectives for aquatic life for mixtures of chemical substances. *Chemosphere* 25:531-542
- Canton JH, Linders JBHJ, Luttik R, Mensink BJWG, Panman E, Van De Plassche EJ, Sparenburg PM, Tuinstra J (1991) Catch-up operation on old pesticides: an integration. *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene (RIVM), Bilthoven, The Netherlands. Report No. 678801002*
- Carroll RJ, Cline DB (1988) An asymptotic theory for weighted least-squares with weights estimated by replication. *Biometrika* 75:35-43
- Carroll RJ, Ruppert D (1988) Transformation and weighting in regression. Chapman & Hall, London
- Caux P-Y, Moore DRJ (1997) A spreadsheet program for estimating low toxic effects. *Environ Toxicol Chem* 16:802-806
- Chapman PF, Crane M, Wiles J, Noppert F, McIndoe E (1996) Asking the right questions: ecotoxicology and statistics. Proceedings, workshop, Royal Holloway University of London, Surrey, UK, SETAC-Europe, UK
- Chapman PM, Cadwell RS, Chapman PF (1996) A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environ Toxicol Chem* 15:77-79
- Chou TC, Rideout DC (1991) Synergism and antagonism in chemotherapy. Academic Press, San Diego
- Chou TC, Talalay P (1977) A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetic systems. *J Biol Chem* 252:6438-6442
- Chou TC, Talalay P (1981) Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. *Eur J Biochem* 115:207-216
- Chou TC, Talalay P (1983) Analysis of combined drug effects: A new look at a very old problem. *Trends Pharmacol Sci* 11:450-454
- Chou J, Chou TC, Talalay P (1983) Computer simulations of drug effects: quantitation of synergism, summation and antagonism of multiple drugs. *Pharmacologist* 25:175-175

- Chou TC, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27-55
- Christensen ER, Chen CY (1985) A general noninteractive multiple toxicity model including Probit, Logit and Weibull transformations. *Biometrics* 41:711-725
- Christensen ER, Chen C-Y (1991) Modeling of combined toxic effects of chemicals. *Toxic Substances Journal* 11:1-63
- Cochran WG, Cox GM (1950) *Experimental designs*, New York, John Wiley & Sons
- Colby SR (1967) Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. *Weeds* 15:20-22
- Cox C (1990) Fieller's theorem, the likelihood and the delta method. *Biometrics* 46:709-718
- Cronin MTD, Dearden JC (1993) The comparative toxicology of the Microtox test. In: M Richardson (ed) *Ecotoxicology Monitoring*. VCH: Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokio, pp 213-223.
- Crump K (1984) A new method for determining allowable daily intakes. *Fund Appl Toxicol* 4:854-871
- Crump KS (1995) Calculation of benchmark doses from continuous data. *Risk Analysis* 15:79-89
- Darroch JN (1976) No-interaction in contingency tables. In: *Proceedings of the 9th International Biometric Conference, I*, 296-316, Raleigh, North Carolina, Biometric Society
- De Wolf W, Canton JH, Deneer JW, Wegmann RCC, Hermens JLM (1988) Quantitative structure-activity relationships and mixture-toxicity studies of alcohols and chlorohydrocarbons: reproducibility of effects on growth and reproduction of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicol* 12:39-49
- Deneer JW, Seinen W, Hermens JLM (1988) Growth of *Daphnia magna* exposed to mixtures of chemicals with diverse modes of action. *Ecotoxicol Environ Saf* 15:72-77.
- Deneer JW, Sinnige TI, Seinen W, Hermens JIM (1988) The joint toxicity to *Daphnia magna* of industrial organic chemicals at low concentrations. *Aquatic Toxicol* 12:33-38
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (1975) *Wirkungen von Kombinationen der Pestizide. Kommission für Pflanzenschutz, Pflanzenbehandlungs- und Vorratsschutzmittel. Mitteilung IX*. Bold, Boppard
- DIN 38 412 Teil 34. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L): Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum* - Leuchtbakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien. Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (März 1991)
- DIN/ISO 8692. Wachstumshemmtest mit den Süßwasseralgen *Scenedesmus subspicatus* und *Selenastrum capricornutum*. Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- Drescher K, Bödeker W (1995) Concepts for the assessment of combined effects of substances: the relationship between concentration addition and independent action. *Biometrics* 51:716-730
- Dunnett CW (1955) A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *JASA* 50:1096-1121
- Dunnett CW (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20:482-491
- Efron B, Tibshirani R (1993) *An introduction to the bootstrap*. Chapman & Hall, London
- EG (Europäische Gemeinschaften) (1976) Richtlinie des Rates vom 4.5.1976 betreffend die Verschmutzung infolge der Ableitung bestimmter gefährlicher Stoffe in die Gewässer der Gemeinschaft. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften v. 18.5.76, Nr. L 129/23 (Richtlinie 76/464/EEC)*
- EIFAC (European Inland Fisheries Advisory Commission, Working Party on Water Quality Criteria for European freshwater fish) (1980) Report on combined effects on freshwater fish and other aquatic life of mixtures of toxicants in water. EIFAC Tech Pap 37
- EIFAC (European Inland Fisheries Advisory Commission, Working Party on Water Quality Criteria for European freshwater fish) (1987). Revised report on combined effects on freshwater fish and other aquatic life of mixtures of toxicants in water. EIFAC Tech Pap 37, Rev 1
- EI-Saidi MA (1993) A power transformation for generalized logistic response function with application to quantal bioassay. *Biom J* 35:715-726

- El-Saidi MA (1995) A symmetric extended logistic model with applications to experimental toxicity data. *Biom J* 37:205-216
- El-Saidi MA, Singh KP, Bartolucci AA (1993) Symmetric generalized logistic distribution: some moment properties and approximation to the normal distribution. *Statistics* 25:79-87
- EPA (US Environmental Protection Agency) (1986) Guidelines for the health risk assessment of chemical mixtures. *Federal Register* 51:34014-34025
- EPA (US Environmental Protection Agency) (1991) Technical support document for water quality-based toxics control. EPA/505/2-90-001, Office of Water, Washington, DC
- EPA (US Environmental Protection Agency) (1996) Benchmark dose technical guidance document. External review draft. Risk Assessment Forum, Washington, DC
- European Commission (1996) Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) no 1488/94 on risk assessment for existing substances. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg
- Faddejew DK, Fadejewa WN (1973) Numerische Methoden der linearen Algebra. 3. Aufl. Berlin
- Fahl GM, Kreft L, Altenburger R, Faust M, Bödeker W, Grimme LH (1995) pH-Dependent sorption, bioconcentration and algal toxicity of sulfonylurea herbicides. *Aquatic Toxicol* 31:175-187
- Faust M, Altenburger R, Bödeker W, Grimme LH (1992) Algentoxizitätstests mit synchronisierten Kulturen. In: Steinhäuser KG, Hansen P-D (Hrsg.) Biologische Testverfahren. Schriftenr Ver Wasser Boden Luft Hyg 89:76-81. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Faust M, Altenburger R, Bödeker W, Grimme LH (1993) Additive effects of herbicide combinations on aquatic non-target organisms. *Sci Total Environ, Suppl* 941-52
- Faust M, Altenburger R, Bödeker W, Grimme LH (1994) Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bull Environ Contam Toxicol* 53:134-141
- Faust M, Altenburger R, Bödeker W, Grimme LH (1996). Kombinationswirkungen von Schadstoffen in Gewässern: Vorhersagbarkeit und Beurteilung. Impulse aus der Forschung (Universität Bremen) Nr. 21 April '96
- Finney DJ (1971a) Probit analysis. 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge
- Finney DJ (1971b) Statistical method in biological assay. Griffin, London
- Fott B, Novakova M (1969) A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species. In FOTT B (ed.) *Studies in Phycology*, pp 10-74. Schweizerbart, Stuttgart
- Franks NP, Lieb WR (1987) What is the molecular nature of general anaesthetic target sites? *Trends Pharmacol Sci* 8:169-174
- Froehner K (1997) Biotest mit dem Leuchtbakterium *Vibrio fischeri*. Vergleichende Prüfung und Bewertung des Kurz- und Langzeit-Lumineszenzhemmtests sowie des Zellvermehrungshemmtests mit ausgewählten Wirkstoffen. Diplomarbeit, Universität Bremen
- Fuller WA, Rao JNK (1978) Estimation for a linear regression model with unknown diagonal covariance matrix. *Ann Stat* 6: 1149-58
- Gessner PK (1988) A straightforward method for the study of drug interactions: an isobolographic analysis primer. *J Am Coll Toxicol* 7:987-1012
- Greco WR, Bravo G, Parsons JC (1995) The Search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev* 47:331-385
- Greco WR, Park HS, Rustum YM (1990) Application of a new approach for the quantitation of drug synergism to the combination of *cis*-diamminedichloroplatinum and 1-*beta*-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 50:5318-5327
- Greco W, Unkelbach H-D, Pösch G, Sühnel J, Kundi M, Bödeker W (1992) Consensus on concepts and terminology for combined action assessment: The *Saariseikä* agreement. *Archives of Complex Environmental Studies* 4(3):65-69
- Grimme LH, Altenburger R, Bödeker W, Faust M (1994) Kombinationswirkungen von Schadstoffen - Toxizität binärer Kombinationen von Pestiziden und Tensiden im Algenbiotest. Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Forschungsbericht 102 07 205
- Grimme LH, Altenburger R, Bödeker W, Faust M (1996a) Kombinationswirkungen in der aquatischen Toxikologie. *UWSF Z Umweltchem Ökotox* 8:150-158

- Grimme LH, Boardman NK (1972) Photochemical activities of a particle fraction P₁ obtained from the green alga *Chlorella fusca*. *Biochem Biophys Res Commun* 49:1617-1623
- Grimme LH, Faust M, Altenburger R (1986) Die Begründung von Wirkungsschwellen in Pharmakologie und Toxikologie und ihre Bewertung aus biologischer Sicht. In Winter G (eds) *Umweltrechtliche Studien: Grenzwerte*. Werner Verlag, Düsseldorf, 35-48
- Grimme LH, Faust M, Bödeker W, Altenburger R (1996b) Aquatic toxicity of chemical substances in combination: still a matter of controversy. *Human and Ecological Risk Assessment* 2:426-433
- Halling-Sørensen B, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Lützhøft HCH, Jørgensen SE (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere* 36:357-393
- Halperin M, Mantel N (1963) Interval estimation of non-linear parametric functions. *JASA* 58:611-627
- Halperin M (1964) Interval estimation of non-linear parametric functions, II. *JASA* 95:168-181
- Hamilton SJ, Buhl KJ (1990) Safety assessment of selected inorganic elements to fry of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawitscha*). *Ecotoxicol Environ Saf* 20:307-324
- Hermens J, Canton H, Janssen P, De Jong R (1984a) Quantitative structure-activity relationships and toxicity studies of mixtures of chemicals with anaesthetic potency: acute lethal and sublethal toxicity to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicol* 5:143-154.
- Hermens J, Canton H, Steyger N, Wegman R (1984b) Joint effects of a mixture of 14 chemicals on mortality and inhibition of reproduction of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicol* 5:315-322
- Hermens J, Leeuwangh P (1982) Joint toxicity of 8 and 24 chemicals to the guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol Environ Saf* 6:302-310.
- Hermens J, Leeuwangh P, Musch A (1984) Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity studies of chloro- and alkylanilines at an acute lethal toxicity level to the guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol Environ Saf* 8:388-394
- Hermens J, Leeuwangh P, Musch A (1985) Joint toxicity of mixtures of groups of organic aquatic pollutants to the guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol Environ Saf* 9:321-326
- Hermens J, Busser F, Leeuwangh P, Musch A (1985a) Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity of organic chemicals in *Photobacterium phosphoreum*: The Microtox test. *Ecotoxicol Environ Saf* 9:17-25
- Hermens J, Broekhuizen E, Canton H, Wegman R (1985b) Quantitative structure activity relationships and mixture toxicity studies of alcohols and chlorohydrocarbons: effects on growth of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicol* 6:209-217
- Herrchen M, Diedrich M, Ludwig B (1995) Anwendung eines Auswahlschemas zur Identifizierung gewässerrelevanter gefährlicher Stoffe. *Umweltbundesamt, Texte 50/95*
- Hewlett PS, Plackett RL (1959) A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs: non interactive action. *Biometrics* 15:591-609
- Hock B (1995) Grundlagen toxischer Mechanismen: Hemmung wichtiger Funktionen durch Antibiotika und andere Zellgifte. In Hock B, Elstner EF (Hrsg.), *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 3. überarb. Aufl., S. 218-283
- Hock B, Fedtke C, Schmidt KR (1995) *Herbizide: Entwicklung, Anwendung, Wirkungen, Nebenwirkungen*. Thieme, Stuttgart 1995
- Hoekstra JA, Van Ewijk PH (1993) Alternatives for the no-observed-effect level. *Environ Toxicol Chem* 12:187-194
- Hoel DG (1987) Statistical aspects of chemical mixtures. In: Vouk VB, Butler ACU, Parke DV, et al. (eds) *Methods for assessing the effects of mixtures of chemicals*. SCOPE, pp 369-377
- Hooper PM (1993) Iterative weighted least squares estimation in heteroscedastic linear models. *JASA* 88:179-184
- Horn M, Vollandt R (1995) *Multiple Tests und Auswahlverfahren*. Gustav Fischer, Stuttgart
- Huber PJ (1981) *Robust statistics*. New York, Wiley.
- Huber W (1993) Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. *Environ Toxicol Chem* 12:1865-1881
- IKSR (Internationale Kommission zum Schutz des Rheins) (1993) Vergleich des Ist-Zustandes des Rheins 1990 bis 1992 mit den Zielvorgaben. Zitiert nach Herrchen, Diedrich, Ludwig (1995)

- ISO/CD 11348 - revised version. Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test). Draft (Sept 1994)
- Jacquez JA, Mather FJ, Crawford CR (1968) Linear regression with non-constant, unknown error variances: sampling experiments with least squares, weighted least squares and maximum likelihood estimators. *Biometrics* 24:607-626
- Jacquez JA, Norussis M (1973) Sampling experiments on the estimation of parameters in heteroscedastic linear regression. *Biometrics* 29:771-80
- Jaworska JS, Schultz TW (1994) Mechanism-based comparisons of acute toxicities elicited by industrial organic chemicals in procaryotic and eucaryotic systems. *Ecotoxicol Environ Saf* 29:200-213.
- Jennrich RI, Moore RH (1975) Maximum likelihood estimation by means of non-linear least squares. In: *Proceedings of the Statistical Computing Section, American Statistical Association* 57-65
- Johnson NL and Kotz S (1995) *Continuous univariate distributions - 1: Distributions in statistics*. New York, Wiley
- Kalberlah F, Hassauer M, Schneider K (1997) Überprüfung der Datenlage im Hinblick auf eine Verbesserung der Dosis-Wirkungsbeziehung als Basis zur Quantifizierung von Sicherheitsfaktoren. Bericht zum F+E Vorhaben 116 06 113, Umweltbundesamt
- Kay R, Little S (1987) Transformations of the explanatory variables in the logistic regression model for binary data. *Biometrika* 74(3):495-502
- Kessler E, Schäfer M, Hümmer C, Kloboucek A, Huss VAR (1997) Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Bot Acta* 110:244-250
- Kodell RL, Pounds JG (1991) Assessing the toxicity of mixtures of chemicals. In: Krewski D, Franklin C (eds) *Statistics in toxicology*, pp 559-591. Gordon & Breach, New York
- Könemann H (1980) Structure-activity relationships and additivity in fish toxicities of environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 4:415-421
- Könemann H (1981) Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: a proposal for a quantitative approach and experimental results. *Toxicology* 19:229-238
- Lakowski R (1995) Some good reasons to ban the use of NOEC, LOEC and related concepts in ecotoxicology. *OIKOS* 73:140-143.
- Lewis MA (1995) Algae and vascular plant tests. In: Rand GM (1995) *Fundamentals of aquatic toxicology*, 2nd edition, Taylor & Francis, London
- Lipnick RL (1989) Narcosis, electrophile and proelectrophile toxicity mechanisms: application of SAR and QSAR. *Environ Toxicol Chem* 8:1-12
- Loewe S (1927) Die Mischarznei. Versuch einer allgemeinen Pharmakologie der Arzneikombinationen. *Klin Wochenschr* 6:1077-1085
- Loewe S (1953) The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneim-Forsch / Drug Res* 3:285-290
- Loewe S (1957) Antagonism and antagonists. *Pharmakol Rev* 9:237-242
- Loewe S, Muischnek H (1926) Über Kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol* 114:313-326
- Lorenzen H (1964) Synchronization of *Chlorella* with light-dark changes and periodical dilution of the populations to a standard cell number. In: Zeuthen E (ed) *Synchrony in Cell Division and Growth*, pp 571-578. Wiley, New York
- LUA NRW (Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen) (1996a) Gewässergütebericht '93/'94. Essen
- LUA NRW (Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen) (1996b) Im deutschen Rheinabschnitt und seinen Nebenflüssen 1990-93 gefundene biozide Wirkstoffe (oberhalb der Bestimmungsgrenze). (pers. Mittlg. unter Bezug auf Schreiben Dr. U. Irmer, Umweltbundesamt an die Mitglieder des LAWA AK QHF im Rheineinzugsgebiet v. 11.1.1996
- LUA NRW (Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen) (1996c) Befunde von Überschreitungen der Zielvorgaben für Pflanzenschutzmittel in nordrheinwestfälischen Nebenflüssen des Rheins 1989-93 (Stand 24.1.96) (pers. Mittlg.)

- Lyr H (ed) (1995) Modern selective fungicides - properties, applications, mechanisms of action -. 2nd Ed., Gustav Fischer, Jena
- Marking LL (1977) Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. In: Mayer FL, Hamelink JL (eds) Aquatic toxicology and hazard evaluation, ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials, pp 99-108
- Marking LL (1985) Toxicity of chemical mixtures. In: Rand GM, Petrocelli SR (eds) Fundamentals of aquatic toxicology. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, pp 164-176
- McCullagh P, Nelder JA (1983) Generalized linear models. Chapman and Hall, New York
- McKim JM, Schmieder PK, Carson RW (1987) Use of respiratory-cardiovascular response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in identifying acute toxicity syndromes in fish: Part 1. pentachlorophenol, 2,4-dinitrophenol, tricaine methanesulfonate and 1-octanol. *Environ Toxicol Chem* 8:295-312
- Meylan WM, Howard PH (1995) Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. *J Pharm Sci* 84: 83-92
- Moore DRJ, Caux P-Y (1997) Estimating low toxic effects. *Environ Toxicol Chem* 16:794-801
- Morgan BJT (1992) Analysis of quantal response data. Chapman & Hall, London
- Morse PM (1978) Some comments on the assessment of joint action in herbicide mixtures. *Weed Sci* 26:58-71
- Noppert F, Van der Hoeven N, Leopold A (1994) How to measure no effect. Towards a new measure of chronic toxicity in ecotoxicology. Workshop Report. Netherlands working group on statistics and ecotoxicology, Delft, The Hague, The Netherlands, p.44
- O'Grady F, Lambert HP, Finch RG, Greenwood D (eds.) (1997) Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy. 7th ed, Churchill Livingstone, New York
- Oehlert GW (1992) A note on the delta method. *The American Statistician* 46:27-29
- Pack S (1993) A review of statistical data analysis and experimental design in OECD aquatic toxicology test guidelines. Shell Research, Sittingbourne, UK, prepared for OECD, zitiert nach European Commission 1996
- Parzen E (1962) On estimation of a probability density function and mode. *Ann Math Stat* 33:1065-1076
- Plackett RL, Hewlett PS (1948) Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particularly insecticides. I. The toxicity of a mixture of poisons. *Ann Appl Biol* 35:347-358
- Plackett RL, Hewlett PS (1952) Quantal response to mixtures of poisons. *J R Statist Soc B* 14:141-163
- Plackett RL, Hewlett PS (1963) A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs: The fitting to data of certain models for two noninteractive drugs with complete positive correlation of tolerances. *Biometrics* 19:517-531
- Pösch G (1991) Evaluation of combined effects with respect to independent action. *Archives of Complex Environmental Studies* 3(1-2):65-74
- Pösch G (1993) Combined effects of drugs and toxic agents. Modern evaluation in theory and practice. Springer, Wien, New York
- Prentice RL (1976) A generalisation of the probit and logit methods for dose response curves. *Biometrics* 32:761-768
- Ratkowsky DA (1990) Handbook of nonlinear regression models. Marcel Dekker, New York
- Read CB (1983) Fieller's theorem. In: Johnson NL, Kotz S (eds) Encyclopaedia of statistical sciences. John Wiley & Sons, New York, pp 86-88
- Reif AE (1984) Synergism in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 73:25-39
- Reinsch CH (1967) Smoothing by spline functions. *Numerische Mathematik* 10:177-183
- Rényi (1977) Wahrscheinlichkeitsrechnung mit einem Anhang über Informationstheorie, 5. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
- Römbke J, Knacker T, Stahl Schmidt-Allner P (1996) Umweltprobleme durch Arzneimittel - Literaturstudie. Forschungsbericht 106 04 121, UBA-Texte 60/96
- Rosen O, Cohen A (1995) Constructing a bootstrap confidence intervall for the unknown concentration in radioimmunoassay. *Statistics in Medicine* 14:935-952

- SAS (1996) SAS/STAT Software: Changes and Enhancements, Release 6.12 Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA
- Schultz TW, Arnold LM, Wilke T, Moulton MP (1990) Relationship of quantitative structure-activity for normal aliphatic alcohols. *Ecotoxicol Environ Saf* 19:243-253
- Schultz TW, Cronin MTD (1997) Quantitative structure-activity relationships for weak acid respiratory uncouplers to *Vibrio fischeri*. *Environ Toxicol Chem* 16: 357-360
- Schüürmann G (1998) Ecotoxic modes of action of chemical substances. In: Schüürmann G, Markert B (eds). *Ecotoxicology. Ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects*. J. Wiley / Spektrum Akademischer Verlag, New York, Heidelberg, pp 665-749
- Sebaugh JL, Wilson JD, Tucker MW, Adams WJ (1991) A study of the shape of dose-response curves for acute lethality at low response: a „megadaphnia study“. *Risk Analysis* 11:633-640
- Shao J, Tu D (1995) *The jackknife and bootstrap*. Springer, New York
- Shihira I, Krauss RW (1965) *Chlorella. Physiology and taxonomy of forty-one isolates*. University of Maryland, College Park. Zitiert nach Fott und Novakova 1969
- Skalski JR (1981) Statistical inconsistencies in the use of no-observed-effect levels in toxicity testing. In: Branson DR, Dickson KL (eds) *Aquatic toxicology and hazard assessment: fourth conference*. ASTM STP 737, American Society for Testing and Materials, pp 377-387
- Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, Kendall RJ, Giddings JM, Giesy JP, Hall Jr LW, Williams WM (1996) Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem* 15:31-76
- Sprague JB (1970) Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Res* 4:3-32
- Sprague JB, Ramsay BA (1965) Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon. *J Fish Res Board Can* 22:425-432
- Staudte RG, Sheater SJ (1990) *Robust estimation and testing*. Wiley & Sons, New York
- Stortelder PBM, Van der Gaag MA, Van der Kooij L A. (1989) Perspectives for water organisms. A ecotoxicological basis for quality objectives for water and sediment. DBW/RIZA Memorandum Nr. 89.016a. 2nd revised version
- Sühnel J (1990) Evaluation of synergism or antagonism for the combined action of antiviral agents. *Antiviral Res* 13:23-40
- Tamiya H (1966) Synchronous cultures of algae. *Ann Rev Plant Physiol* 17:1-26
- Tantawy M, Braumann T, Grimme LH (1984) Uptake and metabolism of phenylpyridazinone herbicide metflurazon during the bleaching and regeneration process of the green alga *Chlorella fusca*. *Pestic Biochem Physiol* 22:224-31
- Terada H (1990) Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ Health Perspec* 87:213-218
- Thompson HM (1996) Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. *Ecotoxicology* 5:59-81
- Tomlin C (ed) (1994) *The pesticide manual*. 10th ed., British Crop Protection Council, Surrey, The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Van der Gaag MA, Stortelder PBM, Van der Kooy LA, Bruggeman WA (1991) Setting environmental quality criteria for water and sediment in the Netherlands: a pragmatic ecotoxicological approach. *European Water Pollution Control* 1:13-20
- Van der Hoeven N, Noppert F, Leopold A (1997) How to measure no effect. Part 1: Towards a new measure of chronic toxicity in ecotoxicology. Introduction and workshop results. *Environmetrics* 8:241-248
- Van Ewijk PH, Hoekstra JA (1993) Calculation of the EC₅₀ and its confidence interval when subtoxic stimulus is present. *Ecotoxicol Environ Saf* 25:25-32
- Van Ewijk PH, Hoekstra JA (1994) Curvature measures and confidence intervals for the linear logistic model. *Appl Statist* 43:477-487
- Van Houwelingen JC (1988) Use and abuse of variance models in regression. *Biometrics* 44:1073-1081
- Van Leeuwen CJ (1991) Ecotoxicological risk management of aquatic pollutants. *Int Conf River Water Quality, Ecological Assessment and Control*, Brussels. Manuscript

- Van Leeuwen CJ, Hermens JLM (eds.) (1995) Risk assessment of chemicals: an introduction. Kluwer, Dordrecht
- Van Wezel A, Cornelissen G, Van Miltenburg K, Opperhuizen A (1996) Membrane burdens of chlorinated benzenes lower the main phase transition temperature in dipalmitoyl-phosphatidylcholine vesicles: implications for toxicity by narcotic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 15:203-212
- Veith GD, Broderius SJ (1987) Structure-toxicity relationships for industrial chemicals causing type (II) narcosis syndrome. In: K L E Kaiser (Ed) *QSAR in Environmental Toxicology - II*. Reidel Publ. Comp., Dordrecht pp 385-91
- Verhaar HJM, Van Leeuwen CJ, Hermens HJLM (1992) Classifying environmental pollutants. 1: Structure-activity relationships for prediction of aquatic pollutants. *Environmental Toxicology - ii*. Reidel Publ. Comp., Dordrecht pp 385-91
- Vighi M, Gramatica P, Finizio A, Todeschini (1997) The use of QSAR in the definition of water quality objectives for mixtures of chemicals. Personal communication
- WSKOWWIN, Vers. 1.26 1996, U.S. Environmental Protection Agency (OPPT): Upgrade of PCGEMS water solubility estimation method (May 1994)

Anhang

Anhangsverzeichnis

A	Stofflisten	165
A1	Selektion <i>ähnlich</i> wirkender Mischungskomponenten für den Algentest	
A1.1	Auswahlliste: Triazine mit spezifischer Wirkung auf die Photosynthese.....	166
A1.2	Komponenten des Referenzgemisches.....	168
A2	Selektion <i>ähnlich</i> wirkender Mischungskomponenten für den Leuchtbakterientest	
A2.1	Auswahlliste: Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung.....	169
A2.2	Komponenten des Referenzgemisches.....	171
A3	Selektion <i>unähnlich</i> wirkender Mischungskomponenten für den Algentest	
A3.1	Auswahlliste 1: Gewässerrelevante Substanzen mit spezifischem, in Algen relevantem Wirkungsmechanismus.....	172
A3.2	Auswahlliste 2: Herbizide und Fungizide mit spezifischem, in Algen relevantem Wirkungsmechanismus.....	174
A3.3	Auswahlliste 3: <i>Tools</i> der pflanzenphysiologischen Forschung mit spezifischem, in Algen relevantem Wirkungsmechanismus.....	181
A3.4	<i>Kandidaten</i> für die experimentelle Vorprüfung.....	188
A3.5	Komponenten des Testgemisches.....	191
A4	Selektion <i>unähnlich</i> wirkender Mischungskomponenten für den Leuchtbakterientest	
A4.1	Auswahlliste 1: Gewässerrelevante Substanzen mit spezifischem, in Bakterien relevantem Wirkungsmechanismus.....	192
A4.2	Auswahlliste 2: Pestizide, Antibiotika und Chemotherapeutika sowie <i>Tools</i> der stoffwechsel-physiologischen Forschung mit spezifischem, in Bakterien relevantem Wirkungsmechanismus.....	193
A4.3	<i>Kandidaten</i> für die experimentelle Vorprüfung.....	201
A4.4	Komponenten des Testgemisches.....	204
B	Experimentelle Methoden	205
B1	Kultivationsbedingungen im Algentest.....	206
B2	Bestimmung der relativen Hemmung der Biolumineszenz im Leuchtbakterientest.....	208
B3	Chemische Analysenmethoden und Stabilität der Substanzen.....	211

C	Biometrische Verfahren	215
C1	Beschreibung der Konzentrations-Wirkungsmodelle.....	216
C2	Verallgemeinerte Schätzmethode der gewichteten kleinsten Quadrate.....	220
C3	Bestimmung der Unsicherheit von Effektkonzentrationen über Bootstrapverfahren.....	230
D	Konzentrations-Wirkungsdaten	235
D1	Konzentrations-Wirkungsdaten der Einzelsubstanzen	
D1.1	Algentoxizität der 18 Substanzen <i>ähnlicher</i> Wirkung (s-Triazine)	238
D1.2	Algentoxizität der 16 Substanzen <i>unähnlicher</i> Wirkung.....	256
D1.3	Bakterientoxizität der 16 Substanzen <i>ähnlicher</i> Wirkung (Entkoppler)	272
D1.4	Bakterientoxizität der 14 Substanzen <i>unähnlicher</i> Wirkung.....	288
D2	Konzentrations-Wirkungsdaten der Gemische	
D2.1	Toxizität der Gemische <i>ähnlicher</i> Wirkung im Algentest.....	303
D2.2	Toxizität der Gemische <i>unähnlicher</i> Wirkung im Algentest.....	305
D2.3	Toxizität der Gemische <i>ähnlicher</i> Wirkung im Leuchtbakterientest.....	307
D2.4	Toxizität der Gemische <i>unähnlicher</i> Wirkung im Leuchtbakterientest.....	309
E	Vorhergesagte und beobachtete Effekt-Konzentrationen multipler Gemische	311
E1	Toxizität der Gemische <i>ähnlicher</i> Wirkung im Algentest.....	312
E2	Toxizität der Gemische <i>ähnlicher</i> Wirkung im Leuchtbakterientest.....	314
E3	Toxizität der Gemische <i>unähnlicher</i> Wirkung im Algentest.....	316
E4	Toxizität der Gemische <i>unähnlicher</i> Wirkung im Leuchtbakterientest.....	318

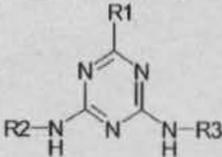
Anhang A Stofflisten

A1	Selektion <i>ähnlich</i> wirkender Mischungskomponenten für den Algentest	
A1.1	Auswahlliste: Triazine mit spezifischer Wirkung auf die Photosynthese.....	166
A1.2	Komponenten des Referenzgemisches.....	168
A2	Selektion <i>ähnlich</i> wirkender Mischungskomponenten für den Leuchtbakterientest	
A2.1	Auswahlliste: Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung.....	169
A2.2	Komponenten des Referenzgemisches.....	171
A3	Selektion <i>unähnlich</i> wirkender Mischungskomponenten für den Algentest	
A3.1	Auswahlliste 1: Gewässerrelevante Substanzen mit spezifischem, in Algen relevantem Wirkungsmechanismus.....	172
A3.2	Auswahlliste 2: Herbizide und Fungizide mit spezifischem, in Algen relevantem Wirkungsmechanismus.....	174
A3.3	Auswahlliste 3: <i>Tools</i> der pflanzenphysiologischen Forschung mit spezifischem, in Algen relevantem Wirkungsmechanismus.....	181
A3.4	<i>Kandidaten</i> für die experimentelle Vorprüfung.....	188
A3.5	Komponenten des Testgemisches.....	191
A4	Selektion <i>unähnlich</i> wirkender Mischungskomponenten für den Leuchtbakterientest	
A4.1	Auswahlliste 1: Gewässerrelevante Substanzen mit spezifischem, in Bakterien relevantem Wirkungsmechanismus.....	192
A4.2	Auswahlliste 2: Pestizide, Antibiotika und Chemotherapeutika sowie <i>Tools</i> der stoffwechsel-physiologischen Forschung mit spezifischem, in Bakterien relevantem Wirkungsmechanismus.....	193
A4.3	<i>Kandidaten</i> für die experimentelle Vorprüfung.....	201
A4.4	Komponenten des Testgemisches.....	204

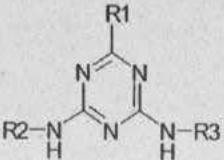
A1 Selektion *ähnlich* wirkender Mischungskomponenten für den Algentest

A1.1 Auswahlliste:

Triazine mit spezifischer Wirkung auf die Photosynthese

Triazin-Typ	Substanz	strikt congener nach folgender Grundstruktur	als kristalline Reinsubstanz lieferbar	aktuelle Verwendung als Herbizid	Gewässerrelevanz (Positivbefunde in Monitoring-Programmen)
		 <p>The diagram shows a 1,3,5-triazine ring. The nitrogen at position 1 has a hydrogen atom (H) and a substituent R2. The nitrogen at position 3 has a substituent R1. The nitrogen at position 5 has a hydrogen atom (H) and a substituent R3.</p>		[TOMLIN 1994]	[HEERCHEN, DIEDRICH, LUDWIG 1995, LUA NRW 1996a-c]
<i>Chlor-s-Triazine</i>	Atrazin Cyanazin Cyprazin Procyazin Propazin Sebuthylazin Simazin Terbuthylazin Trietazin	• • • • • • • • •	• • • • • • • •	• • • • • • •	• • • • • •
<i>Methoxy-s-Triazine</i>	Atraton Prometon Secbumeton Terbumeton	• • • •	• • • •	• •	

(fortgesetzt)

Triazin-Typ	Substanz	strikt congener nach folgender Grundstruktur	als kristalline Reinsubstanz lieferbar	aktuelle Verwendung als Herbizid	Gewässerrelevanz (Positivbefunde in Monitoring-Programmen)
		 <chem>R1c1nc(NR2)nc(NR3)n1</chem>		[TOMLIN 1994]	[HEERCHEN, DIEDRICH, LUDWIG 1995, LUA NRW 1996a-c]

<i>Methylthio-s-Triazine</i>	Ametryn	•	•	•	•
	Aziprotryn		•		•
	Desmetryn	•	•	•	
	Dimethametryn	•	•	•	
	Dipropetryn	•	•		
	Methoprotryn	•	•	•	
	Prometryn	•	•		•
	Simetryn	•	•	•	
Terbutryn	•	•	•		

<i>andere s-Triazine</i>	Hexazinon		•	•	
--------------------------	-----------	--	---	---	--

<i>1,2,4-Triazinone</i>	Isomethiozin		•		
	Metamitron		•	•	
	Metribuzin		•	•	•

A1 Selektion ähnlich wirkender Mischungskomponenten für den Algentest

A1.2 Komponenten des Referenzgemisches

18 s-Triazine

Substanz	CAS RN	MG	Bezug	Charge	Reinheit
Ametryn	834-12-8	227,33	Riedel-de-Haen	91070	98%
Atraton	1610-17-9	211,27	Riedel-de-Haen	90900	95%
Atrazin	1912-24-9	215,69	Riedel-de-Haen	90460	99%
Cyanazin	21725-46-2	240,69	Riedel-de-Haen	91070	99%
Desmetryn	1014-69-3	213,31	Riedel-de-Haen	81830	98%
Dimethametryn	22936-75-0	255,39	Riedel-de-Haen	90200	97%
Dipropetryn	4147-51-7	255,39	Riedel-de-Haen	83000	99%
Methoprotryn	841-06-5	271,39	Riedel-de-Haen	2218	99%
Prometon	1610-18-0	225,29	Riedel-de-Haen	83070	99%
Prometryn	7287-19-6	241,36	Riedel-de-Haen	83300	99%
Propazin	139-40-2	229,71	Riedel-de-Haen	92300	99%
Sebuthylazin	7286-69-3	229,71	Ehrenstorfer	80909	95.9%
Secbumeton	26259-45-0	225,29	Riedel-de-Haen	90900	99%
Simazin	122-34-9	201,66	Riedel-de-Haen	91390	99%
Simetryn	1014-70-6	213,30	Riedel-de-Haen	8054	99%
Terbumeton	33693-04-8	225,29	Riedel-de-Haen	90540	99%
Terbuthylazin	5915-41-3	229,71	Riedel-de-Haen	90790	99%
Terbutryn	886-50-0	241,36	Riedel-de-Haen	91070	99%

A2 Selektion *ähnlich* wirkender Mischungskomponenten für den Leuchtbakterientest

A2.1 Auswahlliste:

Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung

Substanz	CAS-RN	MG	Löslichkeit		log Ko/w	EC50
			geschätzt für Wasser bei 25° C ¹	analytisch getestet in 2 % NaCl ²	geschätzt ³	erwartet nach QSAR ⁴
			mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
2,3,4,5-Tetrachloranilin	634-66-2	230,91	22,8	4,76	3,65	2,84
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	58-90-2	231,89	17,9	8,26	4,09	1,73
2,3,4-Trichlorphenol	15950-66-0	197,45	97,5		3,45	3,04
2,3,5,6-Tetrachloranilin	3481-20-7	230,91	9,5	0,21	3,65	2,84
2,3,5,6-Tetrachlorphenol	935-95-5	231,89	54,9	6,86	4,09	1,73
2,3,5-Trichlorphenol	933-78-8	197,45	90,1		3,45	3,04
2,3,6-Trichlorphenol	933-75-5	197,45	103,4		3,45	3,04
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	197,45	114,1		3,45	3,04
2,4,6-Trichlorphenol	88-06-2	197,45	121		3,45	3,04
2,4-Dichloro-6-nitroanilin	2683-43-4	207,02	60,3	20,39	3,31	3,73
2,4-Dinitro-1-naphtol	605-69-6	234,17	96,1		2,9	6,69
2,4-Dinitroanilin	97-02-4	183,12	1440	4,54	1,84	17,26
2,4-Dinitrophenol	51-28-5	184,11	1970	0,00	1,73	19,64
2,6-Dinitro-4-methylphenol	609-93-8	198,14	512	0,00	2,27	11,51
2,6-Dinitrophenol	573-56-8	184,11	3555		1,73	19,64
3,4-Dinitrophenol	577-71-9	184,11	6712		1,73	19,64
3,5-Dinitroanilin	618-87-1	183,12	1290	11,19	1,29	32,06
4,5-Dichlor-2-nitroanilin	6641-64-1	207,02	60,3	8,32	3,31	3,73
4-Chlor-2,6-dinitroanilin	5388-62-5	217,57	791	0,00	1,93	18,53
4-Phenylazophenol	1689-82-3	198,23	49,8	0,00	3,63	2,49
6-Chlor-2,4-dinitroanilin	3531-19-9	217,57	270	0,00	2,48	9,97

(fortgesetzt)

Substanz	CAS-RN	MG	Löslichkeit		log Ko/w	EC50
			geschätzt für Wasser bei 25° C ¹	analytisch getestet in 2 % NaCl ²	geschätzt ³	erwartet nach QSAR ⁴
			mg/L	mg/L	mg/L	mg/L

CCCP	555-60-2	204,62	53,8	4,44	3,75	2,24
Dinoseb	88-85-7	240,22	24,4	43,72	3,67	2,88
Dinoterb	1420-07-1	240,22	21,1	19,05	3,64	2,98
DNOC (4,6-Dinitro-2-methylphenol)	534-52-1	198,14	692	182,49	2,27	11,51
FCCP	370-86-5	254,17	16,1	0,00	4,15	1,78
Pentabromphenol	608-71-9	488,59	0,026	2,33	5,96	0,45
Pentachlorphenol	87-86-5	266,34	3,1	0,00	4,74	0,96
Pentachlorpyridin	2176-62-7	251,33	22,5		4,03	2,01
Tetrachlorcatechol	1198-55-6	247,89	20		3,61	3,18

¹ errechnet mit WSKOWWIN, Vers. 1.26 1996, U.S. Environmental Protection Agency (OPPT): Upgrade of PCGEMS Water Solubility Estimation Method (May 1994)

² siehe 6.2.2

³ errechnet mit KOWWIN, Vers. 1.54 nach MEYLAN und HOWARD 1995

⁴ Modell: $1/\log EC50(\text{mmol/L}) = 0.489 \log Ko/w + 0.126$ (SCHULZ UND CRONIN, 1997)

A2 Selektion ähnlich wirkender Mischungskomponenten für den Leuchtbakterientest

A2.2 Komponenten des Referenzgemisches

Substanz	CAS-RN	Bezug	Charge	Reinheit
2,3,4-Trichlorphenol	15950-66-0	Riedel	30220	99% (GC)
2,3,5-Trichlorphenol	933-78-8	Riedel	40700	99% (GC/NMR)
2,3,6-Trichlorphenol	933-75-5	Riedel	63260	98.8% (GC)
2,4,6-Trichlorphenol	88-06-2	Merck	32207979	>98% (GC)
2,4-Dinitro-1-naphtol	605-69-6	Fluka	313071/1395	>90% (HPLC); moistened with H ₂ O ~15%
2,4-Dinitrophenol	51-28-5	Riedel	33400	99% (HPLC/NMR) mit ca. 0.3 mLH ₂ O/g
2,6-Dinitro-4-methylphenol	609-93-8	Aldrich	18619BQ	90%; 10 % water
2,6-Dinitrophenol	573-56-8	Aldrich	414-273-3850	97%; 20% water
3,4-Dinitrophenol	577-71-9	Fluka	38300/1	>97% (HPLC); moistened with H ₂ O ~20%
4-Phenylazophenol	1689-82-3	Aldrich	02610KZ	98%
CCCP	555-60-2	Aldrich	10222-096	97%
Dinoseb	88-85-7	Riedel	61930	99.8% (GC)
Dinoterb	1420-07-1	Riedel	60600	99% (GC/NMR)
DNOC	534-52-1	Riedel	60320 und 22800	99% (GC/NMR)
FCCP	370-86-5	Aldrich	03206LN JQ	nicht spezifiziert
Pentachlorphenol	87-86-5	Sigma	76H2634	nicht spezifiziert

A3 Selektion *unähnlich* wirkender Mischungskomponenten für den Algentest

A3.1 Auswahlliste 1:

Gewässerrelevante Substanzen mit spezifischem, in Algen relevantem Wirkungsmechanismus

37 Substanzen mit 7 verschiedenen Wirkorten; zusammengestellt nach [1-4]; Zuordnung zu Wirkorten nach [5,6]

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Chemische Gruppe	Gewässerbefund
----------------------------------	---------	----------	------------------	----------------

ENERGIEBEREITSTELLUNG

Photosynthetischer Elektronentransport (Chloroplasten)	D1-Protein des PS II-Reaktionszentrums	Ametryn	Triazine	[1], [3]	
		Atrazin		[1], [2]	
		Aziprotryn		[3]	
		Cyanazin		[1], [3]	
		Metamitron		[2], [3]	
		Metribuzin		[4]	
		Prometryn		[1], [3]	
		Propazin		[3]	
		Sebythylazin		[3]	
		Simazin		[1]	
		Terbutylazin		[1], [2]	
		Chlortoluron		Harnstoffderivate	[2]
		Diuron			[1], [2]
		Isoproturon			[1], [2]
		Linuron	[1], [3]		
		Methabenzthiazuron	[1], [3]		
		Metobromuron	[3]		
		Metoxuron	[3]		
Monolinuron	[1]				
Monuron	[3]				
(fortgesetzt)	(fortgesetzt)	Propanil	Anilide	[1]	
		Bromacil	Uracile	[4]	
		Bentazon	Benzothiadiazine	[1]	

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Chemische Gruppe	Gewässerbefund
(Photosynthetischer Elektronentransport) fortgesetzt	(D1-Protein des PS II-Reaktionszentrums) fortgesetzt	Chloridazon (Pyrazon)	Pyridazinone	[1], [2], [3]
Protonentranslokation und ATP-Synthese	<i>(Protonophore Entkoppler)</i> (oxidative Phosphorylierung und Photophosphorylierung)	Dinoterb	Dinitrophenole	[1]
		DNOC (Dinitro-2-methylphenol) 2,3,4,5,6-Pentachlorphenol	Chlorphenole	[1] [1], [2]

BIOSYNTHESEN

RNA-Synthese und -Funktionen	rRNA-Polymerase I (rRNA-Synthese)	Metalaxyl Oxadixyl	Phenylamide	[1] [3]
Carotinoidbiosynthese	Phytoendesaturase (PDS)	Norflurazon	Pyridazinone	[3]
Lipidbiosynthese	<i>(unbekannt, jedoch nicht Acetyl-CoA-Carboxylase)</i>	Metazachlor Metolachlor	Chloracetamide	[3] [3]
Steroid-Biosynthese	Cytochrom P450 Steroid-14 α -Demethylasen (Ergosterolbiosynthese)	Penconazol	Imidazol- und Triazol-Derivate	[3]
		Propiconazol		[3]
		Triadimefon	[2]	
		Triadimenol	[3]	

ZELLEILUNG

Mitose	Tubulin	Trifluralin	Dinitroaniline	[1]
--------	---------	-------------	----------------	-----

- [1] HEERCHEN, DIEDRICH und LUDWIG 1995
- [2] LUA NRW 1996a
- [3] LUA NRW 1996b
- [4] LUA NRW 1996c
- [5] HOCK, FEDTKE und SCHMIDT 1995
- [6] LYR 1995

A3 Selektion unähnlich wirkender Mischungskomponenten für den Algentest

A3.2 Auswahlliste 2:

Herbizide und Fungizide mit spezifischem, in Algen relevantem Wirkungsmechanismus

189 Substanzen mit 18 verschiedenen Wirkorten; zusammengestellt nach HOCK 1995, HOCK, FEDTKE und SCHMIDT 1995, LYR 1995, TOMLIN 1994

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Chemische Gruppe	Verwendung H-Herbizid, F-Fungizid
----------------------------------	---------	----------	------------------	---

ENERGIEBEREITSTELLUNG

Photosynthetischer Elektronentransport (Chloroplasten)	D1-Protein des PS II-Reaktionszentrums	Ametryn	Triazine	H
		Atrazin		H
		Cyanazin		H
		Desmetryn		H
		Dimethametryn		H
		Hexazinon		H
		Metamitron		H
		Metribuzin		H
		Prometon		H
		Prometryn		H
		Propazin		H
		Simazin		H
		Simetryn		H
		Terbumeton		H
		Terbuthylazin		H
		Terbutryn	H	
		Trietazin	H	
		Chlorbromuron	Harnstoffderivate	H
		Chlortoluron		H
		Dimefuron		H
Diuron	H			
Fenuron	H			
Fluometuron	H			
Isoproturon	H			

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Chemische Gruppe	Verwendung H-Herbizid, F-Fungizid
(Photosynthetischer Elektronentransport) <i>fortgesetzt</i>	(D1-Protein des PS II-Reaktionszentrums) <i>fortgesetzt</i>	Isouron Linuron Methabenzthiazuron Metobenzuron Metobromuron Metoxuron Monolinuron Neburon Siduron Tebuthiuron Pentanochlor Propanil Desmedipham Phenmedipham Bromacil Lenacil Terbacil Bentazon Chloridazon Pyridat	(Harnstoffderivate) <i>fortgesetzt</i> Anilide Biscarbamate Uracile Benzothiadiazine Pyridazinone	H H
	Redoxkatalase am PS I	Diquat (Dibromid) Paraquat (Dichlorid)	Bipyridilium- Verbindungen	H H
Respiratorischer Elektronentransport (Mitochondrien)	Succinat-Ubichinon-Oxidoreductase-Komplex II	Carboxin Fenfuram Flutolanil Mepronil Oxycarboxin	Carboxanilide	F F F F F
	Cytochrom-bc-Komplex III	Kresoxim-methyl (BAS 490F) ICIA5504	Strobilurine	F F
Protonentranslokation und ATP-Synthese	(<i>Protonophore Entkoppler</i>) (oxidative Phosphorylierung und Photophosphorylierung)	Dinoterb DNOC Pentachlorphenol	Dinitrophenole Chlorphenole	H H,F H,F

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Chemische Gruppe	Verwendung H-Herbizid, F-Fungizid	
(Aminosäurebiosynthese) <i>fortgesetzt</i>	(Acetolactat-Synthase) <i>fortgesetzt</i>	Flumetsulam	Triazolopyrimidin-	H	
		Metosulam	sulfonanilide	H	
		Pyriithiobac (Na-Salz)	Pyrimidinyloxy- Benzoessäuren	H	
	Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSP)	Glyphosat	Aminophosphonate	H	
	Glutamin-Synthetase (GS)	Glufosinate	Aminophosphinate	H	
Porphyrinbiosynthese	Protoporphyrinogenoxidase (PPGO)	Acifluorfen	Diphenyläther	H	
		Aclonifen		H	
		Bifenox		H	
		Chlomethoxyfen		H	
		Chlornitrofen		H	
		Fluoroglycofen		H	
		Fomesafen		H	
		HC-252		H	
		Lactofen		H	
		Oxyfluorfen		H	
		Flumiclorac (Pentyl-Ester)		Phthalimide	H
		Flumioxazin		Pyrazole	H
		Benzofenap	H		
Pyrazolate	H				
Pyrazoxyfen	Sonstige	H			
Oxadiazon		H			
Carotinoidbiosynthese	Phytoendesaturase (PDS)	Norflurazon	Pyridazinone	H	
		Fluridone	4-Pyridone	H	
		Diflufenican	Phenoxynicotinanilide	H	
		Flurtamone	Sonstige	H	
		Flurochloridone		H	
	(<i>unbekannt, jedoch nicht PDS</i>)	Amitrol	Aminotriazole	H	
Lipidbiosynthese (<i>fortgesetzt</i>)	Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase) (<i>fortgesetzt</i>)	Clodinafop	Aryloxypropionsäuren (<i>fortgesetzt</i>)	H	
		Diclofop		H	
		Fenoxaprop		H	
		Fenoxaprop-P		H	

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Chemische Gruppe	Verwendung H-Herbizid, F-Fungizid
(Lipidbiosynthese) fortgesetzt	(Acetyl-CoA-Carboxylase) fortgesetzt	Fluazifop Fluazifop-P Haloxifop Isoxapyrifop Propaquizafop Quizalofop Quizalofop-P XDE 537 (Cyhalofop-butyl) Flamprop Flamprop-M Alloxydim Clethodim Cycloxydim Sethoxidim Tralkoxydim	(Aryloxypropionsäuren) fortgesetzt Arylaminopropionsäuren Cyclohexenone	H H H H H H H H H H H H H H H
	(<i>unbekannt, jedoch nicht ACCase</i>)	Acetochlor Alachlor Butachlor Butenachlor Dimethachlor Dimethenamid Metazachlor Metolachlor Pretilachlor Propachlor Propisochlor Thenylchlor Mefenacet	Chloracetamide Oxyacetamide	H H H H H H H H H H H H H H
Nitrat-Assimilation	Nitratreduktase (NR)	Natriumchlorat	Chlorate	H
Steroid-Biosynthese (fortgesetzt)	Cytochrom P450 Steroid- 14 α -Demethylasen (Ergosterolbiosynthese)	Azaconazole BAS 480F Bitertanol Bromuconazol Cyproconazol	Imidazol- und Triazol- Derivate (fortgesetzt)	F F F F F

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Chemische Gruppe	Verwendung H-Herbizid, F-Fungizid
(Steroid-Biosynthese) <i>fortgesetzt</i>	(Cytochrom P450 Steroid- 14 α -Demethylasen) <i>fortgesetzt</i>	Difenoconazol Diniconazol Fenbuconazol Fluquinconazol Flusilazol Flutriafol Hexaconazol Imazalil Imibenconazol Ipconazol Metconazol Myclobutanil Pefurazoat Penconazol Prochloraz Propiconazol SSF-109 Tebuconazol Tetraconazol Triadimefon Triadimenol Triflumizol Triticonazol	(Imidazol- und Triazol- Derivate) <i>fortgesetzt</i>	F F
Zellwand-Synthese	Cellulose-Synthase (CS)	Dichlobenil Chlorthiamid Isoxaben	Chlorierte Benzonitrile <i>Sonstige</i>	H H H

ZELLTEILUNG

Mitose <i>(fortgesetzt)</i>	Tubulin <i>(fortgesetzt)</i>	Benfluralin Butralin Dinitramin Ethalfuralin Fluazinam	Dinitroaniline <i>(fortgesetzt)</i>	H H H H H
------------------------------------	-------------------------------------	--	--	-----------------------

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Chemische Gruppe	Verwendung H-Herbizid, F-Fungizid
(Mitose) <i>fortgesetzt</i>	(Tubulin) <i>fortgesetzt</i>	Fluchloralin Oryzalin Pendimethalin Prodiamin Trifluralin	(Dinitroaniline) <i>fortgesetzt</i>	H H H H H

A3 Selektion unähnlich wirkender Mischungskomponenten für den Algentest

A3.3 Auswahlliste 3:

Tools der pflanzenphysiologischen Forschung mit spezifischem, in Algen relevantem Wirkungsmechanismus

154 Substanzen mit 41 verschiedenen Wirkorten; zusammengestellt nach HOCK 1995
 (4 mit * markierte Wirkorte werden auch durch Substanzen in Auswahlliste 2 beeinträchtigt; s. A3.2)

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
----------------------------------	---------	----------	-------------

ENERGIEBEREITSTELLUNG

Respiratorischer Elektronentransport (Mitochondrien)	NADH-Ubichinon-Reductase-Komplex I	Amytal Glyceollin Piericidin A (Streptomyc. mobariensis) Rotenon	
	Cytochrom-bc-Komplex III *	Antimycin A	
	Cytochrom-Oxidase-Komplex IV	Azid Cyanid Kohlenmonoxid Schwefelwasserstoff	
	Alternative (Cyanid-resistente) Oxidase	Disulfiram (Tetraethylthiuramdisulfid) m-Clam (m-Chlorbenzhydroxamsäure) Propylgallat SHAM (Salicylhydroxamat)	
Protonentranslokation und ATP-Synthese	F-ATPase (Mitochondrien)	Oligomycin B Rutamycin Triethylblei Venturicidin DCCD (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid)	hemmt auch plastidäre ATPasen hemmt zahlreiche Protonen-translocierende Enzyme
	ATP-ADP-Translocase (Mitochondrien)	Atractylosid Bongkreksäure	kompetitiver Inhibitor nicht-kompetitiver Inhibitor
	(Protonophore Entkoppler) * (oxidative Phosphorylierung und Photophosphorylierung)	DNP (2,4-Dinitrophenol) FCCP (Carbonylcyanid-p-trifluor-methoxyphenylhydrazon)	

(fortgesetzt)

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
(Protonentranslokation und ATP-Synthese) fortgesetzt	(Protonophore Entkoppler) fortgesetzt	CCCP (Carbonylcyanid- m-chlor-phenylhydrazon)	hemmt auch Plasmamembran-H ⁺ -ATPase

BIOSYNTHESEN

Nucleotid-Biosynthese	Purin- und Pyrimidin-Synthese	Azaserin DON	
	Thymidylat-Synthetase	5-Fluorodesoxyuridin 5-Fluoruracil	
DNA-Synthese und -Funktionen	DNA-Polymerase α	Aphidicolin	
	Eukariontische DNA-Topoisomerase I	Etoposid (VP-16) Teniposid (VM-26) Nogalamycin	außerdem interkalierende Wirkung
	Eukaryontische DNA-Topoisomerase II	Berenil Camptothecin	
	Prokaryontische DNA-Topoisomerase II (= Gyrase) (Chloroplasten und Mitochondrien)	Nalidixinsäure Norfloxacin Oxolinsäure	
	DNA-Doppelhelix (interkalierende Verbindungen)	Actinomycin D Acridin (10-Azaanthracen) Acridinorange Ethidiumbromid Proflavin	spezifische Interkalation zwischen GC-Basenpaaren; bewirkt auch Topoisomerase II induzierte DNA-Strangbrüche bewirkt auch Topoisomerase II induzierte DNA-Strangbrüche
RNA-Synthese und -Funktionen	RNA-Polymerase II (mRNA-Synthese)	α -Amanitin	Störung der Codon-Antikodon-Erkennung bei der Proteinsynthese durch Einbau in RNA
	(Nukleotid-Analoga) (Einbau in RNA \rightarrow Funktionsstörung)	8-Azaguanin Cordycepin (3'-Desoxyadenosin)	Störung der Codon-Antikodon-Erkennung bei der Proteinsynthese durch Einbau in RNA Einbau am 3' Ende wachsender RNA-Ketten
	Proteinbiosynthese (fortgesetzt)	Große ribosomale Untereinheit (Ribosomen-Inaktivierung durch Ribotoxine) (fortgesetzt)	Abrin Crocin Curcin

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
(Proteinbiosynthese) fortgesetzt	(Große ribosomale Untereinheit) fortgesetzt	Gelonin MAP (antivirales Protein aus <i>Mirabilis</i>) Mitogillin Modeccin Mormordin I Mormordin II Petroglaucin Phytolacin Restrictocin Ricin Saponin Shiga-Toxin SLT-II v (Shiga-ähnliche Toxin-II-Variante) α -Sarcin	außerdem Effekte auf Peptidketten-Elongation
	Kleine ribosomale Untereinheit (Hemmung der Initiation der Proteinsynthese an Ribosomen)	Aurintricarboxylsäure Edein A Streptomycin Kasugamycin	Bindung an 30s <u>und</u> 40s rRNA Bindung nur an 30s rRNA; außerdem Effekt auf Peptidketten-Elongation Bindung nur an 30s rRNA; Effekt vorwiegend bei best. Pilzen
	80s und 70s Ribosomen (Hemmung der Peptidketten-Elongation an eu- <u>und</u> prokaryontischen Ribosomen)	Tetracyclin Chlortetracyclin Oxytetracyclin Puromycin	Bindung an Akzeptorstelle A (Kontaktregion große/kleine Untereinheit); außerdem Effekt als Ca^{2+} -Chelator Bindung an Akzeptorstelle A (Kontaktregion große/kleine Untereinheit) Hemmung des Peptidyltransfers
	80s Ribosomen (Hemmung der Peptidketten-Elongation <u>nur</u> an eukaryontischen Ribosomen)	Cycloheximid Naramycin B Diacetoxyscirpenol (Trichothecene aus <i>Fusarium</i>) HT-2 Toxin Neosolaniol T-2 Toxin	Hemmung der Peptidyl-tRNA-Translokation; außerdem Effekt auf Proteinsynthese-Initiation, DNA-Synthese und Ionenaufnahme Hemmung der Peptidyl-tRNA-Translokation Hemmung anderer Teilschritte
(fortgesetzt)			

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
(Proteinbiosynthese) fortgesetzt	70s Ribosomen (Hemmung der Peptidketten-Elongation <u>nur</u> an prokaryontischen Ribosomen)	Althiomycin APN Chloramphenicol Erythromycin A Lincomycin Sparsomycin	Hemmung der Peptidyltransferase-Reaktion
		Bottromycin Gentamycin Fusidinsäure Hygromycin B Kanamycin Kirromycin Micrococcin Negamycin Neomycin Thiostrepton Viomycin	Hemmung anderer Teilschritte des Elongationszyklus
	Elongationsfaktor EF-2 (kovalente Modifikation durch ADP-ribosylierende Toxine)	DT (Diphtherie-Toxin) ETA (Pseudomonas-Exotoxin A)	
Glycoproteinsynthese (ER und Golgi-Apparat)	Start-Reaktion der N-Glycosylierung (Transfer von GlcNAc-1-P auf Dolichol-P)	Antibiotikum 24010 Antibiotikum MM-1920 Corynetoxine (aus Corynebakterium) Mycospocidin Streptovirudin Tunicamycin Bacitracin	hemmt auch weitere Teilschritte des Reaktionszyklus
	Glucosidasen	Australin Castanospermin Deoxymannojirimycin Deoxynojirimycin Kifunensin Swainsonin	

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
(Selektiver Ionen-Transport) fortgesetzt	(Anionenkanäle (Blocker)) fortgesetzt	Niflumsäure [2-(α,α,α -Trifluor-m-toluidin)-nicotinsäure] NPPB [5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoesäure]	
	Na^+ - und $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiport	Amilorid Imipramin	
P- und V-ATPasen (Plasmamembran, ER, Tonoplast)	Plasmamembran- H^+ -ATPase (P-ATPase)	Erythrosin B	Hemmung der ATP-Bindung (1. Schritt des Reaktionszyklus); hemmt auch Ca^{2+} -ATPasen (Plasmalemma, ER)
		DCCD (N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid) Gramicidin D	Bindung an eine Proteolipid-Untereinheit ; hemmt auch Tonoplasten- H^+ -ATPase und F-ATPase in Mitochondrien
		Suloctidil Miconazol	hemmt vorwiegend Hefe-P-ATPase hemmt vorwiegend Pflanzen-P-ATPase
	Fusicoccin-Rezeptor (Plasmamembran- H^+ -ATPase-Aktivator, nicht identisch mit H^+ -ATPase)	Fusicoccin	
	Ca^{2+} -ATPase des ER	Cyclopiazonsäure Thapsigargin	
Tonoplasten- H^+ -ATPase (V-ATPase)	Bafilomycine Mersalyl NBD-Cl (7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol)		
Vesikulärer Transport von Makromolekülen	Membranfluß ER \rightarrow Golgi-Apparat / Coatproteine in Golgimembranen (vermutet)	Brefeldin A (BFA)	

STRUKTURELLE ORGANISATION

Cytoskelett-Funktionen	Actin-Filamente	Cytochalasin B Phalloidin	
------------------------	-----------------	------------------------------	--

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
----------------------------------	---------	----------	-------------

ZELLTEILUNG

Mitose	Tubulin *	Colchicin Podophyllotoxin Taxol Vinblastin Vincristin Griseofulvin	Bindung an β -Untereinheit des Tubulin-Dimers; Pflanzen relativ unempfindlich Bindung an β -Untereinheit des Tubulin-Dimers Bindung an α -Untereinheit des Tubulin-Dimers Bindung an α -Untereinheit des Tubulin-Dimers; hemmt auch Zellwandsynthese; wirkt vorwiegend bei Pilzen
--------	-----------	---	--

A3 Selektion unähnlich wirkender Mischungskomponenten für den Algentest

A3.4 Kandidaten für die experimentelle Vorprüfung

40 Substanzen mit 27 verschiedenen Wirkorten; selektiert aus den Auswahllisten 1-3 (s. A3.1 bis A3.3)

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Ergebnis der experimentellen Vorprüfung *
----------------------------------	---------	----------	---

ENERGIEBEREITSTELLUNG

Photosynthetischer Elektronentransport (Chloroplasten)	D1-Protein des PS II-Reaktionszentrums	Terbutylazin Methabenzthiazuron	<i>geeignete Mischungskomponente</i> im Vergleich zu Terbutylazin geringere Steilheit der KWK
	Redoxkatalase am PS I	Paraquat (Dichlorid)	<i>geeignete Mischungskomponente</i>
Respiratorischer Elektronentransport (Mitochondrien)	NADH-Ubichinon-Reductase-Komplex I	Rotenon	ungenügende Wirksamkeit
	Succinat-Ubichinon-Oxidoreductase-Komplex II	Fenfuram Flutolanil Mepronil	<i>geeignete Mischungskomponente</i> nicht geprüft ungenügende Wirksamkeit
	Cytochrom-bc-Komplex III	Kresoxim-methyl (BAS 490F)	<i>geeignete Mischungskomponente</i>
Protonentranslokation und ATP-Synthese	(<i>Protonophore Entkoppler</i>) (oxidative Phosphorylierung und	CCCP (Carbonylcyanid- m-chlor-phenylhydrazon) DNOC	<i>geeignete Mischungskomponente</i> ¹⁾ indirekter Effekt (Farbigkeit) nicht ausschließbar

BIOSYNTHESEN

Nucleotid-Biosynthese	Purin- und Pyrimidin-Synthese	Azaserin	<i>geeignete Mischungskomponente</i>
	Thymidylat-Synthetase	5-Fluoruracil	hohe Varianz
DNA-Synthese und -Funktionen	Prokaryontische DNA-Topoisomerase II (= Gyrase) (Chloroplasten und Mitochondrien)	Nalidixinsäure	<i>geeignete Mischungskomponente</i>
RNA-Synthese und -Funktionen (fortgesetzt)	rRNA-Polymerase I (rRNA-Synthese)	Metalaxyl Oxadixyl	<i>geeignete Mischungskomponente</i> nicht geprüft

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Ergebnis der experimentellen Vorprüfung *
(RNA-Synthese und -Funktionen) fortgesetzt	(<i>Nukleotid-Analoga</i>) (Einbau in RNA → Funktionsstörung)	8-Azaguanin	<i>geeignete Mischungskomponente</i>
Aminosäurebiosynthese	Acetolactat-Synthase (ALS)	Chlorsulfuron Metsulfuron-Methyl Triasulfuron Tribenuron	instabil <i>geeignete Mischungskomponente</i> instabil instabil
	Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSP)	Glyphosat	ungenügende Wirksamkeit, unzureichende Reproduzierbarkeit
	Glutamin-Synthetase (GS)	Glufosinate	spezifische Wirkung in <i>Scenedesmus</i> zweifelhaft, aufwendige Analytik
Proteinbiosynthese	80s und 70s Ribosomen (Hemmung der Peptidketten-Elongation an eu- und prokaryontischen Ribosomen)	Tetracyclin	instabil
	80s Ribosomen (Hemmung der Peptidketten-Elongation <u>nur</u> an eukaryontischen Ribosomen)	Cycloheximid	ungenügende Wirksamkeit
	70s Ribosomen (Hemmung der Peptidketten-Elongation <u>nur</u> an prokaryontischen Ribosomen)	Chloramphenicol	<i>geeignete Mischungskomponente</i>
Porphyrinbiosynthese	Protoporphyrinogenoxidase (PPGO)	Aclonifen Bifenox	<i>geeignete Mischungskomponente</i> ²⁾ ungenügende Wirksamkeit
Carotinoidbiosynthese	Phytoendesaturase (PDS)	Norflurazon	<i>geeignete Mischungskomponente</i>
	(<i>unbekannt, jedoch nicht PDS</i>)	Amitrol	unzureichende Reproduzierbarkeit
Lipidbiosynthese	Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase)	Haloxypop Flamprop-M	ungenügende Wirksamkeit ungenügende Wirksamkeit
	(<i>unbekannt, jedoch nicht ACCase</i>)	Metazachlor	<i>geeignete Mischungskomponente</i>
Steroid-Biosynthese	Cytochrom P450 Steroid-14 α -Demethylasen (Ergosterolbiosynthese)	Triadimenol	<i>geeignete Mischungskomponente</i>
Zellwand-Synthese	Cellulose-Synthase (CS)	Dichlobenil Isoxaben	ungenügende Wirksamkeit ungenügende Wirksamkeit

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Ergebnis der experimentellen Vorprüfung *
----------------------------------	---------	----------	---

TRANSPORT- UND REGULATION

Selektiver Ionen-Transport an Membranen	Ca ²⁺ -Kanäle (Blocker)	Diltiazem Nifedipin	ungenügende Wirksamkeit ungenügende Wirksamkeit
	Anionenkanäle (Blocker)	Ethacrynsäure [(2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy)-essigsäure]	ungenügende Wirksamkeit

ZELLTEILUNG

Mitose	Tubulin	Colchicin Trifluralin	ungenügende Wirksamkeit ungenügende Wirksamkeit
--------	---------	--------------------------	--

* Beurteilung entsprechend den in Abschnitt 5.3 angegebenen Anforderungen

KWK - Konzentrations-Wirkungskurve

- 1) Bei den höchsten getesteten Einzelstoffkonzentrationen von CCCP kann ein zusätzlicher indirekter Effekt, hervorgerufen durch die gelbe Farbe, nicht ausgeschlossen werden. Bei der Toxizitätstestung von Gemischen wurden jedoch nur Konzentrationen unterhalb der Einzelstoff-EC₅₀ eingesetzt. Die Reduktion des Lichtgenusses der Algen ist dabei geringer als 4 %. Bei den verwendeten Kultivationsbedingungen (s. Anhang B1) sind jedoch Reduktionen der Lichtintensität bis zu 10 % ohne Einfluß auf Wachstum und Vermehrung der Algen. Ein indirekter Effekt war somit hinreichend ausgeschlossen.
- 2) Die gelbe Farbe von Aclonifen ist in den getesteten Konzentrationsbereichen irrelevant (Lösungen erscheinen klar).

A3 Selektion unähnlich wirkender Mischungskomponenten für den Algentest

A3.5 Komponenten des Testgemisches

15 unähnlich spezifisch wirkende Substanzen + 1 kationisches Tensid (QAC-12)

Substanz	CAS RN	MG	Bezug	Charge	Reinheit
Aclonifen	74070-46-5	264,67	Riedel-de-Haen	31110	99%
8-Azaguanin	134-58-7	152,12	Fluka	245483/1-1193	>99%
Azaserin	115-02-6	173,10	Fluka		>99%
CCCP (Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon)	555-60-2	204,62	Aldrich	10222-096	97%
Chloramphenicol	56-75-7	323,14	Fluka	350882/1-496	>99%
Dodecyltrimethylammoniumchlorid	112-00-5	263,90	Eastman-Kodak	910843E	98%
Fenfuram	24691-80-3	201,22	Riedel-de-Haen	41240	99%
Kresoxim-methyl	143390-89-0	313,34	Promochem	831-107	99,7%
Metalaxyl	57837-19-1	279,34	Riedel-de-Haen	11790	99%
Metazachlor	67129-08-2	277,75	Riedel-de-Haen	3410	98%
Metsulfuron-methyl	74223-64-6	381,36	Promochem	70417	99%
Nalidixinsäure	389-08-2	232,24	Merck	K22101419-531	>99,5%
Norflurazon	27314-13-2	303,67	Sandoz		97,5
Paraquat-Dichlorid-3-Hydrat	1910-42-5	311,21	Riedel-de-Haen	7320	99%
Terbuthylazin	5915-41-3	229,71	Riedel-de-Haen	90790	99%
Triadimenol	55219-65-3	295,77	Riedel-de-Haen	92960	99%

A4 Selektion *unähnlich* wirkender Mischungskomponenten für den Leuchtbakterientest

A4.1 Auswahlliste 1:

Gewässerrelevante Substanzen mit spezifischem, in Bakterien relevantem Wirkungsmechanismus

9 Stoffe mit 5 unterschiedlichen Wirkorten. Zusammengestellt nach [1] [2]

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
----------------------------------	---------	----------	-------------

ENERGIEBEREITSTELLUNG (2 WIRKORTE)

Respiratorischer Elektronentransport (Mitochondrien)	Cytochrom-Oxidase-Komplex IV	Metam-Na	(LS)
		Dazomet	(LS)
Protonentranslokation und ATP-Synthese	(Protonophore Entkoppler) (oxidative Phosphorylierung)	2,3,4,5,6-Pentachlorphenol	(PB)
		DNOC	(PB)
		Dinoterb	(PB)

BIOSYNTHESEN (2 WIRKORTE)

RNA-Synthese und -Funktionen	rRNA-Polymerase I (rRNA-Synthese)	Metaxyl	(PB)
Lipidbiosynthese	unbekannt, aber nicht Acetyl-CoA-Carboxylase	Metazachlor Metolachlor	(LS) (LS)

SONSTIGES (1 WIRKORT)

(Membranintegrität)	Membranlipide (Oxidation)	Vinclozolin	(LS)
---------------------	---------------------------	-------------	------

[1] HERRCHEN, M., DIETRICH M., LUDWIG, B.: Anwendung eines Auswahlschemas zur Identifizierung gewässerrelevanter gefährlicher Stoffe, Forschungsbericht 102 04 109, Umweltbundesamt, Texte 50/95, 1995

[2] Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen: Gewässergütebericht '93/94, Essen, 1996

(PB) Positivbefunde in Oberflächengewässern, zitiert nach [1]

(LS) In der Liste der betrachtungswürdigen Pflanzenschutzmittel der Internationalen Kommission zum Schutz des Rheins (IKSR) aufgeführt, zitiert nach [1]

A4.2 Auswahlliste 2:

Pestizide, Antibiotika und Chemotherapeutika sowie Tools der stoffwechsel-physiologischen Forschung mit spezifischem, in Bakterien relevantem Wirkungsmechanismus

zusammengestellt nach HOCK 1995 [1], ALEXANDER, ESTLER und LEGLER 1995 [2]; 205 Substanzen (11 Fungizide, 68 Herbizide, 90 Antibiotika, 5 entzündungshemmende Stoffe, 1 Diuretikum, 1 Insektizid und 32 nicht kommerziell verwendete Stoffe) mit 37 verschiedenen Wirkorten

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
----------------------------------	---------	----------	-------------

ENERGIEBEREITSTELLUNG (7 WIRKORTE)

Respiratorischer Elektronentransport (Mitochondrien)	NADH-Ubichinon-Reductase-Komplex I	Amytal Glyceollin Piericidin A Rotenon	(I)
	Cytochrom-Oxidase-Komplex IV	Azid Cyanid Kohlenmonoxid Schwefelwasserstoff	
	Succinat-Ubichinon-Oxidoreductase-Komplex II	Carboxin Fenfuram Flutolanil Mepronil Oxycarboxin	(F) (F) (F) (F) (F)
	Cytochrom-bc-Komplex III	Kresoxim-methyl (BAS 490F) ICIA5504	(F) (F)
Protonentranslokation und ATP-Synthese	F-ATPase (Mitochondrien)	DCCD Oligomycin B Rutamycin Triethylblei Venturicidin	hemmt zahlreiche Protonen-translocierende Enzyme hemmt auch plastidäre ATPasen
	ATP-ADP-Translocase (Mitochondrien)	Atractylosid Bongkreksäure	kompetitiver Inhibitor nicht-kompetitiver Inhibitor

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
		Pyrazosulfuron Pyriithiobac Rimsulfuron Sulfometuron Thifensulfuron Triasulfuron Tribenuron Triflusulfuron	(H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H)
	Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSP)	Glyphosat	(H)
	Glutamin-Synthetase (GS)	Glufosinate	(H)
Nucleotid-Biosynthese	Purin- und Pyrimidin-Synthese	Azaserin Don	
	Thymidylat-Synthetase	5-Fluorodesoxyuridin 5-Fluoruracil	(CH) (CH)
DNA-Synthese und -Funktionen	Prokaryontische DNA-Topoisomerase II (= Gyrase) (Chloroplasten und Mitochondrien)	Nalidixinsäure Norfloxacin Ofloxacin Oxolinsäure Pipemidsäure	(AB) (AB) (AB) (AB) (AB)
	DNA-Doppelhelix (interkalierende Verbindungen)	Actinomycin D Acridin (10-Azaanthracen) Acridinorange Ethidiumbromid Proflavin	spezifische Interkalation zwischen GC-Basenpaaren; bewirkt auch Topoisomerase II induzierte DNA-Strangbrüche bewirkt auch Topoisomerase II induzierte DNA-Strangbrüche
	DNA-Doppelhelix (Metabolite greifen Helix an)	Ornidazol Metronidazol Nitrofurantoin 5-Fluorodesoxyuridin	(AB) (AB) (AB) (AB)

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
RNA-Synthese und -Funktionen	RNA-Polymerase II (mRNA-Synthese)	α -Amanitin Rifamycin SV Rifampin	Störung der Codon-Antikodon-Erkennung bei der Proteinsynthese durch Einbau in RNA (AB) (AB)
	<i>(Nukleotid-Analoga)</i> (Einbau in RNA → Funktionsstörung)	8-Azaguanin Cordycepin (3'-Desoxyadenosin) α -Sarcin	Störung der Codon-Antikodon-Erkennung bei der Proteinsynthese durch Einbau in RNA Einbau am 3' Ende wachsender RNA-Ketten außerdem Effekte auf Peptidketten-Elongation
Folsäure-Biosynthese	<i>(Kompetitive Antagonisten der p-Aminobenzoesäure)</i>	Sulfaperin Sulfametyldiazin Sulfamethoxin Sulfamethoxazol Sulfamerazin Sulfanilamid Sulfadiazin Sulfacarbamid Sulfalen Sulfaguanol Sulfathiazol Sulfisomidin	(AB) (AB) (AB) (AB) (AB) (AB) (AB) (AB) (AB) (AB) (AB) (AB) (AB)
	Dihydrofolatreduktase	Cycloguanil Pyrimethamin Tetroxoprim Trimethoprim	(AB) (AB) (AB) (AB)
Lipidbiosynthese	Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase)	Alloxydim Clethodim Clodinafop Cycloxydim Diclofop Fenoxaprop Fenoxaprop-P Flamprop Flamprop-M	(H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H)

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
		Fluazifop Fluazifop-P Haloxyfop Isoxapyrifop Propaquizafop Quizalofop Quizalofop-P Sethoxidim Tralkoxydim XDE 537 (Cyhalofop-butyl)	(H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H)
	(unbekannt, jedoch <u>nicht</u> ACCase)	Acetochlor Alachlor Butachlor Butenachlor Dimethachlor Dimethenamid Matazachlor Metolachlor Pretilachlor Propachlor Propisochlor Thenylchlor	(H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H) (H)
Protein-Biosynthese	30S rRNA	Aurintricarboxylsäure	Verhinderung der mRNA-Bindung an die kleine ribosomale Untereinheit
	30S rRNA (Inhibierung der Initiation)	Amikacin Edein A Gentamicin Gentamicin A Kanamycin Kanamycin A Kasugamycin Neomycin B Paromycin	(AB) (AB) (AB) (AB) (AB) (AB) (AB) (AB) (AB)

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
		Sisomicin	(AB)
		Spectinomycin	(AB)
		Streptomycin	(AB)
		Tobramycin	(AB)
	30S rRNA (Inhibierung der Elongation)	7-Chlortetracyclin	(AB)
		Chlortetracyclin	(AB)
		Demeclocyclin	(AB)
		Doxycyclin	(AB)
		Minocyclin	(AB)
		Rolitetracyclin	(AB)
		Tetracyclin	(AB)
	50S rRNA (Inhibierung der Elongation)	Azidamfenicol	(AB)
		Azithromycin	(AB)
		Chloramphenicol	(AB)
Clarithromycin		(AB)	
Clindamycin		(AB)	
Dirithromycin		(AB)	
Erythromycin		(AB)	
Flurithromycin		(AB)	
Josamycin		(AB)	
Lincomycin		(AB)	
Oleandomycin	(AB)		
Puromycin	(AB)		
Roxithromycin	(AB)		
Spiramycin	(AB)		
Thiamphenicol	(AB)		
	Elongationsfaktor-G	Fusidinsäure	(AB)
	Zellwand-Biosynthese	N-Acetylglucosamin-3-phosphoenolpyruvat-Transferase	Fosfomycin (AB) (Phosphoenolpyruvat-Analogen)

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
----------------------------------	---------	----------	-------------

	Alaninisomerase (D-Alanyl-D-Alanin-Synthetase)	D-Cycloserin	(AB)
	(glykosidische Verknüpfung der Peptidoglycanstränge des Mureins)	Bacitracin A	(AB)
		Vancomycin	(AB)
	Mureinsynthetase (D-Alanin-Transpeptidase)	Amoxicillin	(AB)
		Ampicillin	(AB)
		Apalcillin	(AB)
		Azidocillin	(AB)
		Aztreonam	(AB)
		Bacampicillin	(AB)
		Carbencillin	(AB)
		Cefaloridin	(AB)
		Cefradin	(AB)
		Ceftazidim	(AB)
		Epicillin	(AB)
		Imipenem	(AB)
		Latomoxef	(AB)
		Loracarbef	(AB)
		Mecillinam	(AB)
		Piperacillin	(AB)
	Pivampicillin	(AB)	
	Pivmecillinam	(AB)	
	Ticarcillin	(AB)	

TRANSPORT- UND REGULATION (7 WIRKORTE)

Selektiver Ionen-Transport an Membranen	Ca ²⁺ -Kanäle (Blocker)	D 600 (Gallopamil)	(E)
		Diltiazem	(E)
		Nifedipin	(E)
		Verapamil	(E)

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Wirkort	Substanz	Anmerkungen
	Anionenkanäle (Blocker)	Ethacrynsäure IAA-94 Niflumsäure NPPB	(D) (E)
	<i>(Ionophor für divalente Kationen)</i>	A23187	
	<i>(Ionophor für monovalente Kationen)</i>	Gramicidin	(AB)
	<i>(Na/H Ionophor)</i>	Monensin	(AB)
Membranfunktionen	(Grenzflächenaktivität)	Tyrocidin Polymyxin B	(AB) Einlagerung in die Zellmembran, Verdrängung von Ca^{2+} (AB) und Mg^{2+} . Dadurch Leckbildung und Inhibierung von Transportsystemen

- [1] HOCK, B. Grundlagen toxischer Mechanismen: Hemmung wichtiger Funktionen durch Antibiotika und andere Zellgifte. In HOCK, B. & Elstner, E. F. (Hrsg.), Schadwirkungen auf Pflanzen. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 3. überarb. Aufl. 1995, S. 218-283.
- [2] ALEXANDER, M., ESTLER, C.-J., LEGLER, F.: Antibiotika und Chemotherapeutika, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2. Auflage, 1995

- (AB) Vorwiegende Verwendung als Antibiotikum und Bakterizid
 (CH) Vorwiegende Verwendung als Chemotherapeutikum
 (D) Vorwiegende Verwendung als Diuretikum
 (E) Vorwiegende Verwendung als entzündungshemmendes Mittel
 (F) Vorwiegende Verwendung als Fungizid
 (H) Vorwiegende Verwendung als Herbizid
 (I) Vorwiegende Verwendung als Insektizid
 kein Eintrag kein kommerzieller Gebrauch

A4 Selektion unähnlich wirkender Mischungskomponenten für den Leuchtbakterientest

A4.3 Kandidaten für die experimentelle Vorprüfung

50 Stoffe mit 32 voneinander abgrenzbaren Wirkorten; selektiert aus den Auswahllisten 1 und 2 (s. A4.1 und A4.2)

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Substanz	Auswahlgrund *	Ergebnis der experimentellen Vorprüfung**
----------------------------------	----------	----------------	---

ENERGIEBEREITSTELLUNG (6 Wirkorte)

(Isocyanat-Precursor)	Dazomet Metam	Gewässerrelevanz Gewässerrelevanz	instabil instabil
NADH-Ubichinon-Reductase-Komplex I	Rotenon	Gewässerrelevanz, Verfügbarkeit	ungenügende Wirksamkeit
Succinat-Ubichinon-Oxidoreductase-Komplex II	Carboxin Flutolanil		ungenügende Wirksamkeit ungenügende Wirksamkeit
Cytochrom-bc-Komplex III	Kresoxim-methyl	Verfügbarkeit	ungenügende Wirksamkeit
(Protonophore Entkoppler)	DNOC Dinoseb	Verfügbarkeit, Gewässerrelevanz Verfügbarkeit, Gewässerrelevanz	KWB nicht reproduzierbar KWB nicht reproduzierbar
rRNA-Polymerase I (rRNA-Synthese)	Metalaxyl Benalaxyl	Verfügbarkeit, Gewässerrelevanz Verfügbarkeit	Mischungskomponente nicht geprüft

BIOSYNTHESEN (19 Wirkorte)

Acetolactat-Synthase (ALS)	Chlorsulfuron Metsulfuron	Verfügbarkeit, Verfügbarkeit, Hydrolysestabilität	ungenügende Wirksamkeit ungenügende Wirksamkeit
Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSP)	Glyphosat	Einziger Vertreter	KWB nicht reproduzierbar
Glutamin-Synthetase (GS)	Glufosinat	Einziger Vertreter	Nicht einschätzbares Wechselwirkungspotential
Purin- und Pyrimidin-Synthese	Azaserin	Verfügbarkeit	Mischungskomponente
Thymidylat-Synthetase	5-Fluoruracil	Verfügbarkeit	Mischungskomponente

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Substanz	Auswahlgrund *	Ergebnis der experimentellen Vorprüfung**
Prokaryontische DNA-Topoisomerase II (= Gyrase)	Nalidixinsäure Ofloxacin	Vorerfahrung, Verfügbarkeit Verfügbarkeit	<i>Mischungskomponente</i> nicht geprüft
DNA-Doppelhelix (interkalierende Verbindungen)	Actinomycin D	Spezifität der Interkalierung	<i>Mischungskomponente</i>
DNA-Doppelhelix (Metabolite greifen Helix an)	Ornidazol Metronidazol	Verfügbarkeit Verfügbarkeit	ungenügende Wirksamkeit ungenügende Wirksamkeit
(Nukleotid-Analoga)	8-Azaguanin Cordycepin	Verfügbarkeit Verfügbarkeit	<i>Mischungskomponente</i> nicht geprüft
(Kompetitive Antagonisten der p-Aminobenzoessäure)	Sulfadiazin Sulfacarbamid	Geringe Metabolisierung Geringe Metabolisierung	ungenügende Wirksamkeit ungenügende Wirksamkeit
Dihydrofolatreduktase	Pyrimethamin Trimethoprim	Verfügbarkeit Verfügbarkeit	ungenügende Wirksamkeit ungenügende Wirksamkeit
Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCCase)	Fluazifop Flamprop		ungenügende Wirksamkeit ungenügende Wirksamkeit
(Lipidbiosynthese, nicht ACCCase)	Metazachlor Metolachlor	Verfügbarkeit, Vorerfahrungen	ungenügende Wirksamkeit
30S rRNA, (Inhibierung der Initiation)	Streptomycin Gentamicin	Verfügbarkeit Verfügbarkeit	<i>Mischungskomponente</i> nicht geprüft
30S rRNA (Inhibierung der Elongation)	Chlortetracyclin Tetracyclin	Verfügbarkeit, Gewässerrelevanz Verfügbarkeit, Gewässerrelevanz	instabil instabil
50S rRNA (Inhibierung der Elongation)	Chloramphenicol Thiamphenicol	Verfügbarkeit, Gewässerrelevanz Verfügbarkeit, Gewässerrelevanz	<i>Mischungskomponente</i> nicht geprüft
Elongationsfaktor-G	Fusidinsäure	Einziger Vertreter	<i>Mischungskomponente</i>
N-Acetylglucosamin-3-phosphoenolpyruvat-Transferase	Fosfomycin	Einziger Vertreter	ungenügende Wirksamkeit
Alaninisomerase (D-Alanyl-D-Alanin-Synthetase)	D-Cycloserin	Einziger Vertreter	<i>Mischungskomponente</i>
Mureinsynthetase - (D-Alanin-Transpeptidase)	Ampicillin Amoxicillin	Verfügbarkeit, geringe Metabolisierung Verfügbarkeit, geringe Metabolisierung	<i>Mischungskomponente</i> nicht geprüft

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Substanz	Auswahlgrund *	Ergebnis der experimentellen Vorprüfung**
----------------------------------	----------	----------------	---

TRANSPORT UND REGULATION (4 Wirkorte)

Ca ²⁺ -Kanäle (Blocker)	Diltiazem Nifedipin	Verfügbarkeit, nur zwei Vertreter Verfügbarkeit, nur zwei Vertreter	<i>Mischungskomponente</i> nicht geprüft
Anionenkanäle (Blocker)	Ethacrynsäure Niflumsäure	Verfügbarkeit Verfügbarkeit	<i>Mischungskomponente</i> nicht geprüft
(Na/H Ionophor)	Monensin	Einziger Vertreter	ungenügende Wirksamkeit
Oberflächenaktivität)	Dodecylpyridiniumbromid	siehe Kapitel 6.1.2	<i>Mischungskomponente</i>

SONSTIGES (3 Wirkorte)

(Lipidperoxidation)	Vinclozolin	Gewässerrelevanz, einziger Vertreter	ungenügende Wirksamkeit
(Oxidation von SH-Gruppen)	Phenylquecksilberacetat	Verfügbarkeit	KWB nicht reproduzierbar
(Jodierung von Tyrosinresten)	Jod	einziger Vertreter	KWB nicht reproduzierbar

* Erläuterungen zu den Auswahlgründen

Einziger Vertreter:	Für den angegebenen Wirkungsmechanismus ist kein weiterer Vertreter bekannt
Geringe Metabolisierung:	Nach ALEXANDER, ESTLER und LEGLER (1995) geringste Metabolisierung unter den angegebenen Vertretern des jeweiligen Wirkungsmechanismus
Gewässerrelevanz:	Der angegebene Stoff ist in Auswahlliste 1 (A4.1) als gewässer-relevanter Stoff aufgeführt
Verfügbarkeit:	Der angegebene Stoff war in ausreichender Qualität und Quantität über den Chemikalienhandel beziehbar

** Erläuterungen zu den Ergebnissen der experimentellen Vorprüfung

KWB nicht reproduzierbar	Die KWB (Konzentrations-Wirkungsbeziehung) der Substanz ist nicht reproduzierbar
ungenügende Wirksamkeit	Die Substanz zeigt im Bereich der Wasserlöslichkeit weniger als 80% Effekt
instabil	Die Substanz ist instabil (unter Testbedingungen mehr als 20% Verlust)
nicht einschätzbares Wechselwirkungspotential	Die Substanz besitzt ein starkes chemisches Wechselwirkungspotential (Chelatbildner)
nicht geprüft	Die Substanz wurde nicht experimentell untersucht, da schon ein Vertreter dieses Wirkungsmechanismus' im Gemisch vertreten ist.
Mischungskomponente	Die Substanz wurde als Mischungskomponente selektiert

A4 Selektion unähnlich wirkender Mischungskomponenten für den Leuchtbakterientest

A4.4 Komponenten des Testgemisches

13 unähnlich spezifisch wirkende Substanzen + 1 kationisches Tensid (Dodecylpyridiniumbromid)

Beeinflußter Stoffwechselprozess	Substanz	CAS-RN	Bezug	Charge	Reinheit
----------------------------------	----------	--------	-------	--------	----------

BIOSYNTHESEN

Purin- und Pyrimidin-Synthese	Azaserin	115-02-6	Fluka	11430, Lot 298196 590	> 99% (TLC)
Thymidylat-Synthetase	5-Fluoruracil	51-21-8	Fluka	45756, Lot 329394/130697	>99% (HPLC)
Prokaryontische DNA-Topoisomerase II (= Gyrase)	Nalidixinsäure	389-08-2	Merck	K22101419531	> 99,5% (HPLC)
DNA-Doppelhelix (interkalierende Verbindung)	Actinomycin D	50760	Boehringer	02987	95% (HPLC)
(Nukleotid-Analoga)	8-Azaguanin	134-58-7	Fluka	245483/1 1193	99% (HPLC)
RNA-Polymerase I (RNA-Synthese)	Metalaxyl	57837-19-1	Riedel	45565, Lot 40130	99%
30S rRNA (Inhibierung der Initiation)	Streptomycin	57-92-1	Fluka	25096	95%
50S rRNA (Inhibierung der Elongation)	Chloramphenicol	56-75-7	Fluka	23275, Lot 350882/1/496	99%
Elongationsfaktor-G	Fusidinsäure	6990-06-3	Sigma	F-0881, Lot 126H1177	für biochemische Zwecke
Alaninisomerase (D-Alanyl-D-Alanin-Synthetase)	D-Cycloserin	68-41-7	Merck	K22796797 625	99%
Mureinsynthetase (D-Alanin-Transpeptidase)	Ampicillin	69-53-4	Fluka	1044 Lot 358277/142197	99% (NT)

TRANSPORT UND REGULATION

Ca²⁺-Kanäle (Blocker)	Diltiazem	42399-41-7	Fluka	38489, Lot 336146/1396	99% (TLC)
Anionenkanäle (Blocker)	Ethacrynsäure	58-54-8	Sigma	E-4754, Lot 17H0269	für biochemische Zwecke
(Grenzflächenaktivität)	Dodecylpyridiniumbromid	104-73-4	Promochem	BA 1103, Lot LT-F/69	95%

Anhang B Experimentelle Methoden

B1	Kultivationsbedingungen im Algentest.....	206
B2	Bestimmung der relativen Hemmung der Biolumineszenz im Leuchtbakterientest.....	208
B3	Chemische Analysenmethoden und Stabilität der Substanzen.....	211

Anhang B1 Kultivationsbedingungen im Algentest

Tab. B2.1: Kultivations- und Testbedingungen im Algentest

	Anzucht	Toxizitätstestung
Testorganismus	Scenedesmus vacuolatus, Stamm 211-15, Algensammlung Pringsheim Göttingen	
Kultivationsmedium	Modifiziert nach Grimme & Boardman 1972 (s. Tab. B2.2)	
pH	6.4	6.7 (nach Carbonat-Zugabe)
CO ₂ -Versorgung	Kontinuierliche Begasung mit wasserdampfgesättigtem Luft/CO ₂ -Gemisch (2 Vol. % CO ₂)	1.5 mmol/L NaHCO ₃ (Anfangskonzentration)
Licht	13-18 W/m ² entsprechend 370 μE m ⁻² s ⁻² Lampentyp: Kombination aus Osram L36W/41 Interna und Osram L36W11 Daylight	
Temperatur	28 °C ± 0.5 °C	
Kulturgefäße	Zylindrische Glaskolben mit konischem Boden, 30x200 mm, ø innen 2.6 cm	Pyrex-Rundbodengläser mit Schraubverschluß und teflonbeschichteter Dichtung, 20 ml Nennvolumen
Sedimentationsverhinderung	durch Begasungsstrom	Magnetrührer
Kulturvolumen	40 mL	15 mL
Synchronisation	Licht-Dunkel-Wechsel von 14:10 h, periodische Verdünnung (24 h) auf Animpf-Zelldichte	
Animpf-Zelldichte	10 ⁶ Zellen/ml	7.5 x 10 ⁴ Zellen/mL

Tab. B2.2: Nährstoffkonzentrationen im Algenkultivationsmedium

Makroelemente	mmol/L	Mikroelemente	mmol/L
Na ⁺	12.06	Ca ²⁺	0.09999
K ⁺	8.01	Mn ²⁺	0.00253
Mg ²⁺	1.01	Zn ²⁺	0.00070
NO ₃ ⁻	8.01	Fe-EDTA-Komplex	0.02482
Cl ⁻	8.14	MoO ₄ ²⁻	0.000016
H ₂ PO ₄ ²⁻ , HPO ₄ ²⁻	3.97	H ₃ BO ₃	0.00809
SO ₄ ²⁻	1.04		

Anhang B2 Bestimmung der relativen Hemmung der Biolumineszenz im Leuchtbakterientest

Die ISO/CD 11348 gibt ein Verfahren zur Berechnung der relativen Hemmung im Biolumineszenzhemmtest mit *Vibrio fischeri* vor. Dabei wird die Biolumineszenz jeder Probe zweimal bestimmt: Zu Beginn der Testung (vor der Zugabe des Testgutes) und nach der Inkubationszeit von 30 Minuten. Das Verhältnis dieser beiden Messungen wird zur Bestimmung eines Korrekturfaktors KF verwendet:

$$KF = \frac{BL(K)_E}{BL(K)_B} \quad (1)$$

$BL(K)_E$ stellt hierbei die Biolumineszenz einer unbehandelten Kontrolle zum Ende der Inkubationszeit dar, $BL(K)_B$ entsprechend die Biolumineszenz einer Kontrolle zum Beginn der Testung. Der Korrekturfaktor dient dazu, die Dynamik der Biolumineszenz zu modellieren und gibt an, wie stark sich die Biolumineszenz über die Inkubationszeit verändert. Es wird davon ausgegangen, daß die Größe dieser Veränderung in allen Proben identisch ist. Die Biolumineszenz, die bei den behandelten Proben nach Ende der Inkubationszeit gemessen wird, ist also auf zwei Faktoren zurückzuführen: Die Einwirkung des Testgutes und die „normale“ Veränderung der Biolumineszenz, wie sie auch ohne Substanzeinwirkung aufgetreten wäre. Zur Berechnung der relativen Hemmung wird demzufolge der „normalen“ Dynamik der bakteriellen Biolumineszenz Rechnung getragen. In einem ersten Schritt wird über den Korrekturfaktor geschätzt, wie die Biolumineszenz einer Probe am Ende der Testung ausgesehen hätte, wenn kein Testgut anwesend gewesen wäre ($BL(P)_E(\text{erwartet})$):

$$BL(P)_E(\text{erwartet}) = KF * BL(P)_B \quad (2)$$

Dieser Wert wird mit der tatsächlich am Ende der Testung bestimmten Biolumineszenz ($BL(P)_E(\text{bestimmt})$) in Beziehung gesetzt, um die relative Hemmung zu bestimmen:

$$\% \text{Hemmung} = 100 - \left(100 * \frac{BL(P)_E(\text{bestimmt})}{BL(P)_E(\text{erwartet})} \right) \quad (3)$$

Der Bezug auf die unbehandelten Proben erfolgt also indirekt über den Korrekturfaktor. Dieser wird in einer realen Testung über die Mittelwerte der Biolumineszenzdaten aller Kontrollen zu Beginn und Ende der Testung ermittelt. Setzt man die Gleichung (1) und (2) in Gleichung (3) ein, so ergibt sich:

$$\% \text{Hemmung} = 100 - \left(100 * \frac{BL(P)_E}{BL(P)_B} * \frac{BL(K)_B}{BL(K)_E} \right) \quad (4)$$

Unabdingbare Voraussetzung für diese Art der Kalkulation ist ein Korrekturfaktor, der in allen Proben identisch ist. Das heißt, würde man zum Beispiel einen Versuch nur beste-

hend aus unbehandelten Kontrollen durchführen, so müßte das Verhältnis BL_E/BL_B für alle „Proben“ konstant sein.

Es zeigte sich jedoch, daß genau diese Voraussetzung bei den im Projekt angewendeten Verfahren nicht gegeben war. Im Falle des akuten Leuchtbakterientestes mußte aufgrund von Löslichkeitsproblemen der zu testenden Substanzen mit sehr kleinen Vorlagen an Bakteriensuspension (100 μ L) gearbeitet werden. Dadurch ergab sich ein nicht linearer Trend, dem ein konstanter Korrekturfaktor nicht gerecht wurde. Dies ist in Abbildung B2.1 am Beispiel einer realen Testung (2,6-Dinitro-4-Methylphenol) dargestellt. Deutlich ist an den sechs in diesem Versuch verwendeten Kontrollen zu sehen, daß der Korrekturfaktor in Abhängigkeit von der Startzeit¹ steigt (von 1.98 bis 2.29). Um diesen Trend zu modellieren, wurde statt eines konstanten Korrekturfaktors eine Polynomregression 2-ten Grades durchgeführt (siehe Abbildung B2.1). Für alle Berechnungen der Hemmwerte im akuten Leuchtbakterientest wurde diese Methode verwendet. Die in (4) definierte Gleichung

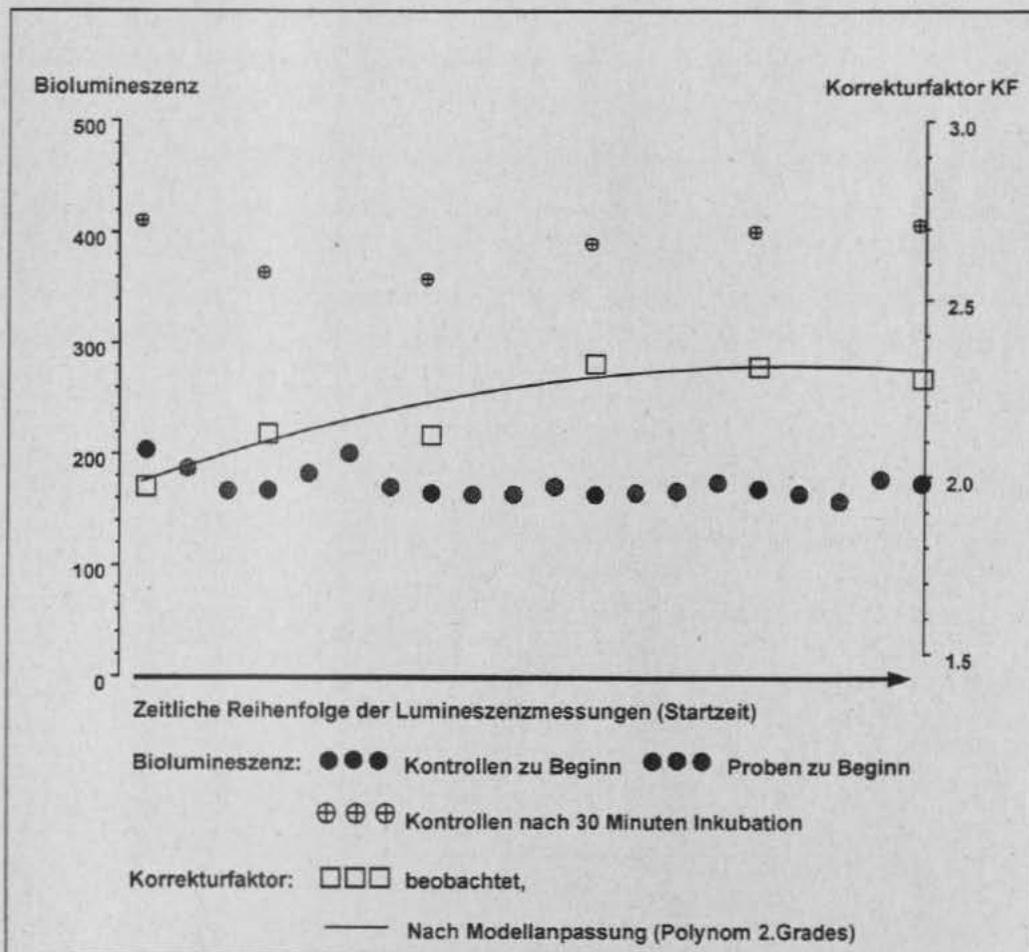


Abb. B2.1: Abhängigkeit der Lumineszenzwerte von der Startzeit

¹ Als Startzeit sei die Zeit definiert, die vom Start des Experimentes (Einfüllen der Bakteriensuspension in die Küvetten) bis zur Messung von BL_B verstreicht. Da mit drei Thermoblöcken mit jeweils 20 Proben gearbeitet wurde und für die eigentliche Messung jeweils 30 Sekunden benötigt wurden, beträgt der Unterschied in der Startzeit zwischen der ersten und der letzten Kontrolle 30 Minuten.

chung ändert sich also nur dahingehend, daß kein konstanter Korrekturfaktor verwendet wird, sondern für jede Probe aufgrund der Regressionsgleichung ein individueller Kontrollwert geschätzt wird.

Die Konsequenzen für die Berechnung der Hemmwerte im Niedrigeffektbereich sind dramatisch: Wird die ursprüngliche Annahme eines konstanten Korrekturfaktors (≈ 2.2) beibehalten, so ergibt sich für die kleinste applizierte Konzentration ein Effekt von ca. 5 %. Wird hingegen ein gleitender Korrekturfaktor verwendet, so ergibt sich hier ein Effekt von ca. -2 % (vgl. Wirkdaten im Anhang D1.3).

Für die Bestimmung des NOEC wird für jede Kontrolle ein Hemmwert unter Bezug auf das arithmetische Mittel aller Kontrollen berechnet. Die Größe der Variabilität dieser „Kontroll-Hemmwerte“ ist ausschlaggebend dafür, welche Konzentration als signifikant über dieser Variabilität liegend detektiert werden. Durch Verwendung eines gleitenden Korrekturfaktors ergeben sich deutlich geringere Variabilitäten der „Kontroll-Hemmwerte“. Bei der varianzanalytischen NOEC-Bestimmung kann es somit eher zu einer statistischen Ablehnung kommen, der NOEC wird also bei kleineren Konzentrationen detektiert, als unter Verwendung eines konstanten Korrekturfaktors.

Im Langzeit-Biolumineszenztest, der für die Analyse der Mischungstoxizität unähnlich wirkender Stoffe eingesetzt wurde, zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Leuchten zu Beginn der Testung und am Ende der Inkubationszeit. Offensichtlich haben sich während der langen Testdauer die anfänglichen systematischen Unterschiede ausgeglichen. Aus diesem Grunde wird für die Berechnung der relativen Hemmung in diesem Testsystem kein Bezug zur Messung am Beginn der Versuches hergestellt, sondern die Hemmung einzig unter Bezug auf die Biolumineszenz der Kontrollen am Ende der Inkubationszeit berechnet. Damit ergibt sich die schon in Kapitel 6.2.2 dargestellte Formel:

$$\% \text{ Hemmung} = 100 - \left(100 * \frac{BL(P)_E}{BL(K)_E} \right) \quad (5)$$

Anhang B3: Chemische Analysemethoden und Stabilität der Substanzen

In Tests eingesetzte Nominalkonzentrationen wurden analytisch validiert. Als Methode wurde in allen Fällen die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) eingesetzt. Die genauen Analysenbedingungen sind in den Tabellen B3.1 bis B3.4 dokumentiert. Des Weiteren wurden die in den Biotests untersuchten Komponenten mit den gleichen Analyseverfahren auf ihre physikalisch-chemische Stabilität unter den Bedingungen des jeweiligen Biotests untersucht. Dazu wurde die Konzentration einer Lösung zu Beginn des Testes (t_0) und nach Ablauf der Inkubationszeit (t_{24}) chemisch analysiert. Im folgenden sind die Ergebnisse dieser Stabilitätsuntersuchungen für beide im Algentest und für die im Langzeit-Leuchtbakterientest analysierten Stoffe unähnlicher Wirkung dokumentiert. Die Konzentrationsstabilität von Dodecyltrimethylammoniumchlorid unter den Bedingungen des Algentestes ist bereits in einem früheren Vorhaben untersucht worden (Grimme et al. 1994) und wurde deshalb nicht erneut geprüft. Für die Chlor- und

Tab. B3.1: Bedingungen für die chemische Analyse der Komponenten des Gemisches ähnlicher Wirkung im Algentest (s-Triazine)

Verwendete Geräte: Intelligent Pump L-6200A, Autosampler AS-2000A oder AS-4000A UV-VIS Detektor L-4250 oder Diodenarray-Detektor L7450 Chromato-Integrator D-2500 (alle Geräte Firma Merck, Darmstadt)				
Stationäre Phase: Superspher RP18e; Länge: 125 mm; Durchmesser 3.1 mm; Partikeldurchmesser 4 μ m				
Mobile Phase: Acetonitril (ACN) und Acetatpuffer (AcP) (1 mmol/L, pH 6.4) in den angegebenen Mischungsverhältnissen				
Detektion: UV bei 220 nm		Flußrate: 0,5 mL/min		
Substanz	Mobile Phase	Konzentration zu t_0 (μ mol/L)	Konzentration zu t_{24} (μ mol/L)	Verlust (%)
Ametryn	50 % ACN / 50 % AcP	0.654	0.652	0.3
Atraton	40 % ACN / 60 % AcP	0.143	0.147	(-2.8)
Atrazin	40 % ACN / 60 % AcP	0.520	0.500	3.8
Cyanazin	40 % ACN / 60 % AcP	0.240	0.240	0.0
Desmetryn	40 % ACN / 60 % AcP	0.160	0.160	0.0
Dimethametryn	60 % ACN / 40 % AcP	0.198	0.168	15.2
Dipropetryn	50 % ACN / 50 % AcP	0.408	0.400	2.0
Methoprotryn	40 % ACN / 60 % AcP	0.190	0.180	5.3
Prometon	40 % ACN / 60 % AcP	1.420	1.440	(-1.4)
Prometryn	50 % ACN / 50 % AcP	0.140	0.142	(-1.4)
Propazin	40 % ACN / 60 % AcP	0.734	0.692	5.7
Sebuthylazin	40 % ACN / 60 % AcP	0.600	0.590	1.7
Secbumeton	40 % ACN / 60 % AcP	0.76	0.770	(-1.3)
Simazin	40 % ACN / 60 % AcP	0.589	0.600	(-1.9)
Simetryn	40 % ACN / 60 % AcP	0.120	0.120	0.0
Terbumeton	40 % ACN / 60 % AcP	0.280	0.290	(-3.6)
Terbuthylazin	40 % ACN / 60 % AcP	0.210	0.200	4.8
Terbutryn	50 % ACN / 50 % AcP	0.787	0.684	13.1

Dinitrophenole, die ausschließlich im Kurzzeit-Leuchtbakterientest Verwendung fanden, wurden lediglich exemplarische Stabilitäts-Untersuchungen an DNOC, 2,4-Dinitrophenol und CCCP durchgeführt. Nach der 30-minütigen Inkubationszeit lagen die Konzentrationen zwischen 98 % und 101 % der Ausgangskonzentrationen. Aufgrund der sehr kurzen Inkubationszeit und der hohen chemisch-strukturellen Ähnlichkeit wurden keine weiteren Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Für zwei Substanzen, Azaserin und Streptomycin standen keine geeigneten chromatographischen Analyseverfahren zur Verfügung. Ersatzweise wurde deshalb eine biologische Stabilitätskontrolle durchgeführt (siehe 6.2).

Tab. B3.2: Bedingungen für die chemische Analyse der Komponenten des Gemisches *ähnlicher* Wirkung im Leuchtbakterientest (Chlor- und Dinitrophenole)

Verwendete Geräte: Pumpe L7100 Autosampler L7250 Diodenarray-Detektor L7450 Chromato-Integrator D-2500 (alle Geräte Firma Merck, Darmstadt)	
Stationäre Phase: Superspher RP18e; Länge: 75 mm; Durchmesser 4 mm; Partikeldurchmesser 4 µm	
Mobile Phase: 40 % Acetonitril / 60 % H ₃ PO ₄ (0.01 %)	
Detektion: UV bei den angegebenen Wellenlängen	
Flußrate: 0,5 mL/min	
Substanz	Detektion
2,3,4-Trichlorphenol	UV (300 nm)
2,3,5-Trichlorphenol	UV (300 nm)
2,3,6-Trichlorphenol	UV (300 nm)
2,4,6-Trichlorphenol	UV (300 nm)
2,4-Dinitro-1-naphtol	UV (350 nm)
2,4-Dinitrophenol	UV (350 nm)
2,6-Dinitro-4-methylphenol	UV (350 nm)
2,6-Dinitrophenol	UV (350 nm)
3,4-Dinitrophenol	UV (320 nm)
4-Phenylazophenol	UV (330 nm)
CCCP	UV (355 nm)
DNOC	UV (300 nm)
Dinoseb	UV (270 nm)
Dinoterb	UV (250 nm)
FCCP	UV (355 nm)
Pentachlorphenol	UV (250 nm)

Tab. B3.3: Bedingungen für die chemische Analyse der Komponenten des Gemisches *unähnlicher* Wirkung im Algentest

Verwendete Geräte: Intelligent Pump L-6200A Autosampler AS-2000A oder AS-4000A UV-VIS Detektor L-4250 oder Diodenarray-Detektor L7450 Chromato-Integrator D-2500 (alle Geräte Firma Merck, Darmstadt)						
Stationäre Phase: Superspher RP18e; Länge: 125 mm; Durchmesser 3.1 mm; Partikeldurchmesser 4 µm						
Substanz	Laufmittel ¹⁾	Detektion	Flußrate (mL/min)	Konzentration zu t ₀ (µmol/L)	Konzentration zu t ₂₄ (µmol/L)	Verlust (%)
Aclonifen	50% ACN / 50% NaH ₂ PO ₄ 10 mmol/L; pH 7.5	UV (238 nm)	0.8	0.280	0.23	17.9
8-Azaguanin	100 % (NH ₄)H ₂ PO ₄ 5 mmol/L. CTAB 25 mmol/L (pH 8.1). 2.5% Methanol p.a.	UV (248 nm)	1.0	2.330	2.18	6.4
CCCP	50% ACN / 50% H ₃ PO ₄ 10 mmol/L	UV (246 nm)	0.8	0.789	0.795	(-0.8)
Chloramphenicol	20% ACN / 80% H ₃ PO ₄ 10 mmol/L	UV (279 nm)	0.8	258	221	14.3
Fenfuram	35% ACN / 65% H ₂ O	UV (262 nm)	0.8	38.3	38.9	(-1.6)
Kresoxim-methyl	70% ACN / 30% H ₂ O	UV (220 nm)	0.8	4.940	4.62	6.5
Metalaxyl	40% ACN / 60% H ₂ O	UV (210 nm)	0.8	88.6	91.6	(-3.4)
Metazachlor	40% ACN / 60% H ₂ O	UV (225 nm)	0.8	1.070	0.92	14.0
Metsulfuron-methyl	35% ACN / 65% H ₃ PO ₄ 10 mmol/L	UV (225 nm)	0.8	10.60	10.6	0.0
Nalidixinsäure	30% ACN / 70% Oxalsäure 10 mmol/L	UV (259 nm)	0.8	459	433	5.7
Norflurazon	35% ACN / 65% H ₂ O	UV (240 nm)	0.8	3.95	3.8	3.8
Paraquat-dichlorid	100 % H ₂ O mit 0.1 % Hexansulfonsäure (pH 2.5)	UV (255 nm)	1.0	41.3	41.7	(-1.0)
Terbutylazin	50% ACN / 50% AcP. 1mmol/L (pH 6.4)	UV (220 nm)	0.5	0.28	0.29	(-3.6)
Triadimenol	40% ACN / 60% H ₂ O.	UV (225 nm)	0.5	10.5	8.96	14.7

¹⁾ ACN = Acetonitril; AcP. = Ammoniumacetatpuffer 1mmol/L (pH 6.1); CTAB = Cetyltrimethylammonium Bromid
 Alle Laufmittel *pro analysi* oder *hplc grade*

Tab. B3.4: Bedingungen für die chemische Analyse der Komponenten des Gemisches *unähnlicher* Wirkung im Leuchtbakterientest

Verwendete Geräte: Intelligent Pump L-6200A Autosampler AS-2000A oder AS-4000A UV-VIS Detektor L-4250 oder Diodenarray-Detektor L7450 Chromato-Integrator D-2500 (Alle Geräte Firma Merck, Darmstadt)						
Stationäre Phase: Superspher RP18e; Länge: 125 mm; Durchmesser 3.1 mm; Partikeldurchmesser 4 µm und						
Substanz	Laufmittel ¹⁾	Detektion	Flußrate (mL/min)	Konzentration zu t ₀ (µmol/L)	Konzentration zu t ₂₄ (µmol/L)	Verlust (%)
5-Fluoruracil	10mmol/L (NH ₄)H ₂ PO ₄ , pH 3,8+2,5% MeOH	UV (265nm)	0.5	34.5	35.5	(-2.9)
Actinomycin	65% ACN / 35% H ₂ O	UV (429 nm)	0.5	1	1.1	(-10.0)
Ampicillin	20% ACN / 80% NaH ₂ PO ₄ pH 3,3	UV (215 nm)	0.5	18.1	18.7	(-3.3)
Azaguanin	10mmol/L (NH ₄)H ₂ PO ₄ , pH 3,8+2,5% MeOH	UV (248 nm)	0.5	10	9.4	6.0
Chloramphenicol	30% ACN / 70% 20mmol/L H ₃ PO ₄ , pH 3.0	UV (279 nm)	0.5	1.8	1.85	(-2.8)
Diltiazem	30% ACN / 70 % 10 mM H ₃ PO ₄ , 10 mM Octansulfonsäure	UV (237 nm)	0.5	1000	980	2.0
Dodecylpyridinium-bromid	40 % ACN / 60 % 100 mM Dodecansulfonsäure	UV (254 nm)	0.5	10	9.3	7.0
Ethacrynsäure	50% ACN / 50% 10 mmol/L TEHS	UV (225 nm)	0.5	36.8	37.6	(-2.2)
Metalaxyl	40% ACN / 60% H ₂ O	UV (210 nm)	0.5	5000	4991	0.2
Nalidixinsäure	40% ACN / 10 mmol/L Oxalsäure	UV (256 nm)	0.5	3	3.17	(-5.7)

¹⁾ ACN = Acetonitril; MeOH = Methanol
 Alle Laufmittel *pro analysi* oder *hplc grade*

Anhang C Biometrische Verfahren

	Seite
C1 Beschreibung der Konzentrations-Wirkungsmodelle.....	216
C2 Verallgemeinerte Schätzmethode der gewichteten kleinsten Quadrate.....	220
C3 Bestimmung der Unsicherheit von Effektkonzentrationen über Bootstrapverfahren.....	230

Anhang C1 Beschreibung der Konzentrations-Wirkungsmodelle

Bestehende sigmoide, nichtlineare parametrische Regressionsmodelle (Probit, Logit und Weibull) bilden den in diesem Vorhaben relevanten Effektbereich von mindestens 1-80 % nicht immer über den gesamten Verlauf erwartungstreu ab. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, zusätzliche Funktionen in der Regressionsanalyse zu verwenden. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich 3-parametrische Funktionen mit asymmetrischem Kurvenverlauf verwendet. Nachfolgend werden alle Regressionsmodelle charakterisiert, die auf ihre Eignung für eine Konzentrations-Wirkungsbeschreibung in der aquatischen Toxikologie geprüft wurden und sich als grundsätzlich geeignet erwiesen.

Standardmodelle

$$\text{Probit:} \quad \text{Effekt} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\theta_1 + \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})} \exp(-u^2 / 2) du$$

$$\text{Logit:} \quad \text{Effekt} = \frac{1}{1 + \exp(-\theta_1 - \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.}))}$$

$$\text{Weibull:} \quad \text{Effekt} = 1 - \exp(-\exp(\theta_1 + \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})))$$

Allen Funktionen ist gemeinsam, daß die zu schätzenden Parameter unmittelbar interpretierbar sind: θ_1 bestimmt die Lage des Funktionsverlaufes, θ_2 charakterisiert den Steilheitsgrad und ist somit immer positiv. Die Probit- und Logitfunktionen werden v.a. im Bereich der quantalen Datenanalyse benutzt, wo vorrangig Toleranzverteilungen zu schätzen sind. Ihre Wirkungskurve ist bei logarithmischer Skalierung der Konzentrationsachse, unabhängig von der Parameterwahl, immer punktsymmetrisch um das Wertepaar (EC_{50} , 50 % Effekt). Das 2-parametrische Weibull-Regressionsmodell liefert dagegen einen asymmetrischen Verlauf und wird in der biometrischen Literatur oftmals als Gompertzfunktion oder Extremwertfunktion bezeichnet (Johnson & Kotz 1995).

Modell nach Morgan-Mercier-Flodin

Dieses asymmetrische 2-parametrische Modell (Ratkowsky 1990) eignet sich im Vergleich zu den Standardmodellen besonders zur Beschreibung von im oberen Effektbereich weniger steilen Wirkungskurven.

$$\text{Morgan-Mercier:} \quad \text{Effekt} = 1 - \frac{1}{1 + (\theta_1 \text{ Konz.})^{\theta_2}}$$

Liegt eine steile Konzentrations-Wirkungskurve im oberen Effektbereich vor, so sollte im Gegensatz dazu im unteren Effektbereich ein Kurvenverhalten geringerer Steigung bestehen, um eine gute Anpassung des gesamten Kurvenverlaufes zu erhalten. Passable Startwerte für den Schätzprozeß sind dann $\theta_1 > 20$ und $\theta_2 < 3$.

Generalisierter Logit

Die *Verallgemeinerte Logistische Verteilung* (El-Saidi 1993, 1995, Prentice 1976) wird über zwei Lageparameter festgelegt. Wird jeweils ein Parameter konstant auf 1 gesetzt, so ergeben sich in Verbindung mit dem linearen Term $\theta_1 + \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})$ zwei unterschiedliche Regressionsmodelle:

$$\text{Generalisierter Logit 1: Effekt} = \frac{1}{(1 + \exp(-\theta_1 - \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})))^{\theta_3}}, \theta_3 > 0$$

$$\text{Generalisierter Logit 2: Effekt} = 1 - \frac{1}{(1 + \exp(\theta_1 + \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})))^{\theta_3}}, \theta_3 > 0$$

Der Parameter θ_3 beschreibt die Asymmetrie des Kurvenverlaufs und ist positiv definiert. Da dieser Parameter mit den beiden anderen Parametern unmittelbar gekoppelt ist, gilt deren Bedeutung als Lage- oder Steilheitsparameter nicht mehr. Für $\theta_3=1$ entspricht der *Generalisierte Logit 1* dem 2-parametrischen Logit (Standardmodell). Für $0 < \theta_3 < 1$ liegt eine positiv schiefe Verteilung vor, für $\theta_3 > 1$ eine negativ schiefe. Kleine Werte des Asymmetrieparameters (< 1) haben höhere Werte in den θ_1 und θ_2 zur Folge (10-100), und umgekehrt. Der *Generalisierte Logit 1* eignet sich besonders gut für die Beschreibung von weniger steilen Konzentrations-Wirkungsverläufen im unteren Effektbereich, während hingegen der *Generalisierte Logit 2* Kurvenverläufe geringerer Steilheit im oberen Effektbereich sehr gut abbildet. Da aber v.a. im unteren Effektbereich eher weniger steile Kurvenverläufe in diesem Vorhaben beobachtet wurden und der *Generalisierte Logit 1* sich somit a priori als das geeignetere Modell erwies, wird synonym für *Generalisierter Logit 1* auch die Bezeichnung *Generalisierter Logit* verwendet.

Aranda-Ordaz

Diese von Darroch 1976 erstmals erwähnte und dann von Aranda-Ordaz (1981) ausführlich vorgestellte Verteilung wird vor allem für quantale Assay-Daten und in der Survival-Analyse eingesetzt. Die geeignete Modellform entspricht dann

$$\text{Effekt} = 1 - (1 + \theta_3 \exp(\theta_1 + \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})))^{\theta_3^{-1}}$$

Die Startwerte der Modellparameter im Iterations-Schätzverfahren sind dabei so zu wählen, daß der Term $(1 + \theta_3 \exp(\theta_1 + \theta_2 \log_{10}(\text{Konz.})))$ für alle eingesetzten Konzentrationen immer einen positiven Wert ergibt. Für $\theta_3=1$ liegt das symmetrische Standard-Logitmodell vor, für $\theta_3 \rightarrow 0$ die 2-parametrische Weibullverteilung. Es können sowohl positive als auch negative Asymmetrien modelliert werden. Eine Zufallsvariable mit dieser kumulativen Verteilungsfunktion ist log Burr-verteilt¹ (Morgan 1992).

¹ Die Burr-Verteilung wird über 3 Parameter definiert. Sie basiert im wesentlichen auf einer bedingten Weibull-Verteilung und einer Gamma-Verteilung.

Transformation der Konzentrationsskala

Fast allen Modellen ist gemeinsam, daß vor dem eigentlichen Schätzprozeß eine Transformation der Konzentrationsskala über den Logarithmus zur Basis 10 durchgeführt wird. Es bieten sich aber weitere Transformationen an, um bestehende sigmoide Regressionsmodelle hinsichtlich ihrer Datenanpassung zu verbessern. Beispielsweise kann die Konzentrationsskala über Power-Transformationen vorab variiert werden (Carroll und Ruppert 1988). Ein weiterer grundsätzlicher Ansatz besteht darin, über zusätzliche Modellparameter das Regressionsmodell an die experimentellen Daten flexibler anzupassen. Hierbei bieten sich zwei Möglichkeiten an:

- Polynomdarstellung: Da die Verteilungsfunktion der Standardmodelle (Probit, Logit oder Weibull) über einen linearen Term ($\theta_1 + \theta_2 \log_{10}(\text{Konzentration})$) an die Daten angepaßt wird, kann dieser Term auf ein Polynom 2. Grades (oder höheren Grades) erweitert werden:

$$\theta_1 + \theta_2 \log_{10}(\text{Konzentration}) + \theta_3 (\log_{10}(\text{Konzentration}))^2.$$

- Box-Cox-Transformation (auch „Box-Tidwell-Transformation“ genannt): Anstelle der logarithmischen Transformation zur Basis 10 wird folgende Umformung in das Modell integriert:

$$\text{Konzentration} \Rightarrow \begin{cases} (\text{Konzentration}^{\theta_3} - 1) / \theta_3, & \text{falls } \theta_3 \neq 0 \\ \log_e(\text{Konzentration}), & \text{falls } \theta_3 = 0 \end{cases}$$

Diese von *Box und Tidwell* (1962) ursprünglich zur Symmetrisierung einer schief verteilten Zielvariablen angewandte Transformation wird in vielen Bereichen der Datentransformation eingesetzt (Morgan 1992, Kay und Little 1987). Falls der Transformationsparameter θ_3 als nicht relevant getestet wird ($\theta_3 \approx 0$), entspricht die Modellanpassung der entsprechenden 2-parametrischen Modelle (Hinweis: Der Steilheitsparameter θ_2 unterscheidet sich dann allerdings wegen der \log_e -Transformation).

Auf Grund der Monotonie-Anforderung an die Modelle (steigende Konzentrationen führen zu größeren Effekten) wurde auf die Polynomdarstellung verzichtet, da Regressionsmodelle in Verbindung mit dieser Transformation bei ungünstiger Datenlage durchaus zu nicht monoton steigenden Datenanpassungen führen können. Diese Gefahr ist insbesondere dann gegeben, wenn Effektkonzentrationen extrapolativ geschätzt werden.

Regressionsmodelle mit der Box-Cox-Transformation erwiesen sich als sehr flexibel. Da maximal 3 Modellparameter zugelassen werden sollen, wurden die Standardmodelle somit erweitert auf folgende Regressionsfunktionen:

$$\text{Box-Cox-Logit: Effekt} = \left(1 + \exp\left(-\theta_1 - \theta_2 \frac{\text{Konz}^{\theta_3} - 1}{\theta_3}\right) \right)^{-1}$$

$$\text{Box-Cox-Weibull: Effekt} = 1 - \exp\left(-\exp\left(\theta_1 + \theta_2 \frac{\text{Konz}^{\theta_3} - 1}{\theta_3}\right)\right)$$

$$\begin{aligned} \text{Box-Cox-Probit: Effekt} &= \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{k(\text{Konz.})} \exp(-u^2/2) du, \quad k(\text{Konz.}) = \theta_1 + \theta_2 \frac{\text{Konz.}^{\theta_3} - 1}{\theta_3} \\ &= \text{Probit} \left(\theta_1 + \theta_2 \frac{\text{Konz.}^{\theta_3} - 1}{\theta_3} \right) \end{aligned}$$

Da Funktionen mit dieser Transformation vor allem im Niedrigeffektbereich zu sehr flexiblen Modellanpassungen führen, sollten für eine valide Schätzung dieses Bereiches vergleichsweise mehr Daten vorliegen und nur interpolativ ermittelte EC_{01} -Schätzungen benutzt werden. Ist dies nicht gegeben, besteht die Gefahr, daß zwar der beobachtete Effektbereich hervorragend beschrieben wird, der jenseits davon extrapolativ geschätzte Kurvenverlauf aber der Realität nicht entspricht: Der Kurvenverlauf kann dann auf einem Effektniveau „hängen bleiben“, d.h. sich nur sehr langsam mit abnehmender bzw. zunehmender Stoffkonzentration den Asymptoten minimalen bzw. maximalen Effektes nähern.

Anhang C2 Verallgemeinerte Schätzmethode der gewichteten kleinsten Quadrate

Die Anpassung eines nichtlinearen Regressionsmodells ist immer dann problematisch, wenn eine inhomogene, nichtkonstante Variabilität in den Beobachtungen vorliegt (Heteroskedastizität). Als ein adäquates Schätzverfahren wurde deswegen die *Verallgemeinerte Methode der gewichteten Minimale-Quadrate-Schätzung* gewählt (*generalized least square*, Carroll and Ruppert 1988), deren Anpassung an die jeweilige experimentelle Situation nicht standardisiert ist. Die Implementierung als generelles Schätzverfahren in diesem Vorhaben für alle nichtlinearen Regressionsmodelle wird deswegen nachfolgend ausführlich beschrieben.

Das heteroskedastische nichtlineare Regressionsmodell F wurde definiert als

$$\left. \begin{aligned} E(\text{Effekt}_i) &= f(\text{Konzentration}_i, \theta) \\ \text{Varianz}(\text{Effekt}_i) &= \sigma^2 g^2(E(\text{Effekt}_i)) = \sigma^2 / w_i \end{aligned} \right\} E(\text{Effekt}_i) = F(\text{Konzentration}_i, \theta, w_i).$$

Das heißt, der zu erwartende Effekt der applizierten i -ten Konzentration wird über ein Regressionsmodell f beschrieben, wobei dieses Modell über unbekannte Regressionsparameter $\theta = (\theta_1, \theta_2, \dots)$ festgelegt wird. Weiterhin soll eine funktionale Abhängigkeit der Beobachtungsvarianz vom erwarteten Effektniveau vorliegen, die als Produkt einer vom Effekt unabhängigen Varianz σ^2 und dem Quadrat einer effektspezifischen Gewichtsfunktion g beschrieben werden kann. Diese Funktion soll nachfolgend zu einem Gewichtsfaktor w vereinfacht werden, d.h.

$$w_i = \left(\frac{1}{g(E(\text{Effekt}_i))} \right)^2$$

Sind diese vom Effektniveau abhängigen Gewichtsfaktoren bekannt, so folgt als Erweiterung der einfachen Methode der kleinsten Quadrate eine Schätzmethode, die als *Methode der gewichteten kleinsten Quadrate* bezeichnet wird. Die Idee hierbei ist, die Summe aller gewichteten Abweichungsquadrate zwischen den beobachteten Effekten und den Modellerwartungen über die Modellparameter θ zu minimieren

$$\min_{\theta} \sum_{i=1}^N \left[\text{Beobachteter Effekt}_i - F(\text{Konzentration}_i, w_i, \theta) \right]^2$$

(N Anzahl der Beobachtungen),

so daß die entsprechende eindeutige Lösung dieser Bedingung als Schätzung $\hat{\theta}$ der Modellparameter und somit des Modells interpretiert wird. Nach Bates und Watts (1988) kann diese Bedingung vereinfacht werden zu

$$\min_{\theta} \sum_{i=1}^N w_i \left[\text{Beobachteter Effekt}_i - f(\text{Konzentration}_i, \theta) \right]^2$$

Diese Forderung läßt sich leicht interpretieren, da höhere Gewichtungen w_i zu höheren Abweichungsquadraten der i -ten Beobachtung führen und ihr somit eine höhere Wertigkeit im Schätzprozeß beimessen. Sind die Abweichungen zwischen der Beobachtung und

der geschätzten Modellerwartung zusätzlich normalverteilt, so entsprechen die über diese Schätzmethode bestimmten Modellparameter sogar einer gleichmäßig varianzoptimalen und erwartungstreuen Schätzung, d.h. andere mögliche Schätzverfahren können zu keiner besseren Schätzung führen. Ist das Regressionsmodell korrekt gewählt und liegen hinreichend viele Beobachtungen vor, so ist die gewichtete Minimale-Quadrate-Schätzung im allgemeinen weniger variabel als die einfache Minimale-Quadrate-Schätzung (Gauss-Markov-Theorem, vgl. Carroll and Ruppert 1988).

Verallgemeinerte Methode der gewichteten kleinsten Quadrate

Da die Gewichtungen w_i in diesem Vorhaben a priori nicht bekannt waren, mußten sie aus den vorliegenden experimentellen Daten geschätzt werden. Da nach Modelldefinition diese Schätzungen \hat{w}_i aber abhängig vom erwarteten Effektniveau sind, so bedeutet dies gerade eine Abhängigkeit von der Modellschätzung, die den erwarteten Effekt einer definierten Konzentration bestimmt. Hieraus ergibt sich einerseits das Problem, wie denn statistisch „gute“ Schätzungen dieser Gewichtungen bestimmt werden, andererseits die Schwierigkeit, daß sowohl die primär interessierenden Modellparameter als auch diese Gewichte simultan geschätzt werden müssen, da beide Komponenten voneinander abhängen und somit gekoppelt sind. Dieses Problem kann dadurch gelöst werden, daß diese beiden Komponenten jeweils schrittweise einzeln geschätzt werden, und dabei jeweils die eine Schätzung als „Vorschätzung“ in den darauffolgenden Schätzprozeß der anderen Komponente einfließt. Am Beispiel eines beliebigen Regressionsmodell mit drei Modellparametern wird das Prinzip dieses iterativen Algorithmus schrittweise aufgezeigt:

Schritt 1: Die unbekannt Parameter $\theta = (\theta_1, \theta_2, \theta_3)$ werden ungewichtet über die Methode der kleinsten Quadrate geschätzt: $\hat{\theta}_{LS} = (\hat{\theta}_1, \hat{\theta}_2, \hat{\theta}_3)$.

Schritt 2: Die unbekannt Gewichtungen w_i werden auf Grundlage des im vorherigem Schritt geschätzten Modells als \hat{w}_i bestimmt.

Schritt 3: Auf Grundlage der Gewichtungen \hat{w}_i werden die Modellparameter über die Methode der gewichteten kleinsten Quadrate erneut geschätzt als $\hat{\theta}_{WLS} = (\hat{\theta}_1, \hat{\theta}_2, \hat{\theta}_3)$.

Schritt 4: Hieraus werden die Gewichtungen \hat{w}_i wiederum bestimmt.

Schritt 5: Die Schritte 3 und 4 werden so oft wiederholt, bis eine Konvergenz in den Modellschätzern eingetreten ist. Das Konvergenzkriterium δ wird vorab vorgegeben und ist dann erfüllt, wenn die absolute Differenz jedes Parameterschätzers zwischen der i -ten und der $(i-1)$ -ten Iteration kleiner als dieses Konvergenzkriterium ist:

$$|\hat{\theta}^i - \hat{\theta}^{i-1}| \leq \delta$$

Dieser iterative Schätzalgorithmus¹ wird als *generalized least square* bzw. *Verallgemeinerte Methode der gewichteten kleinsten Quadrate* bezeichnet (Carroll & Ruppert 1988) und führte bei allen in diesem Vorhaben verwendeten Regressionsmodellen immer zu einer Konvergenz. Als Konvergenzkriterium diente dabei die Schranke $\delta=10^{-4}$. Dies führte bei den zweiparametrischen Regressionsmodellen durchschnittlich zu 6 Iterationsschritten und bei den dreiparametrischen zu 12. Der Schätzprozeß im Schritt 1 wurde dabei nicht als ein Iterationsschritt gezählt. Die maximal benötigte Anzahl von Iterationsschritten betrug 26 (*Generalisiertes Logit-Modell* mit einem sehr steilen Konzentrations-Wirkungsverlauf).

Gewichtungen

Um eine valide Schätzung der notwendigen Gewichtungen zu ermöglichen, wurde jede definierte Substanzkonzentration mehrfach appliziert (Replikate). Über die beobachtete Variabilität in den Effekten kann so eine Abschätzung der Gewichtungen vorgenommen werden. Die Beobachtungsvariabilität wurde dabei über die Varianz abgeschätzt, so daß der entsprechende Kehrwert dieser Schätzung als Gewichtung diente:

$$\hat{w}_i = 1/\hat{s}_i^2 \quad (\hat{s}_i^2 \text{ Varianzschätzung für das Effektniveau der } i\text{-ten Konzentration}),$$

$$\hat{s}_i^2 = (m_i - 1)^{-1} \sum_{j=1}^{m_i} (\text{beobachteter Effekt}_{i,j} - \text{erwarteter Effekt}_j)^2$$

Höhere Varianzschätzungen implizieren eine größere Unsicherheit dieser Daten für die gesamte Modellbildung als vergleichsweise kleinere und führen so zu kleineren Gewichtungen. So bekommen alle Beobachtungen derselben Konzentration eine identische Gewichtung zugewiesen, Gewichtungen für Beobachtungen von unterschiedlichen Konzentrationen unterscheiden sich hingegen. Um den Modellanforderungen zu genügen und somit zu validen Modellschätzungen zu gelangen, wurden zusätzlich die so definierten Gewichtsschätzungen normiert auf eine Gesamtsumme von 1

$$\sum_{i=1}^N \hat{w}_i = 1 \quad (\text{vgl. van Houwelingen 1988}),$$

wodurch eine direkte vergleichende Interpretation der Gewichtungen möglich ist.

Für eine konsistente Schätzung der Varianz auf Grundlage der beobachteten empirischen Variabilität werden mindestens 10 Replikate benötigt (Jacquez, Mather und Crawford 1968, Carroll und Cline 1988, Jacquez und Norusis 1973). Allerdings kann selbst dann noch die unbekannte Varianz dramatisch überschätzt werden (Fuller und Rao 1978).

¹ Die Verfahrensschritte 1 bis 5 werden bei endlicher Anzahl von Iterationsschritten in der Literatur auch als *iteratively reweighted least square*-Schätzungen bezeichnet (Carroll & Ruppert 1988). Nach Jennrich und Moore (1975) sind die daraus resultierenden Schätzungen identisch mit denen des Maximum-Likelihood-Schätzverfahrens exponentieller Familien (vgl. auch McCullagh und Nelder 1983).

Damit stellt sich die Frage, wie denn valide Schätzungen der Beobachtungsvarianz bestimmt werden können, wenn tatsächlich nur 3 Replikate je Konzentrationsstufe im Experiment eingesetzt werden?

Um dieses Problem zu umgehen, wurde vorausgesetzt, daß grundsätzlich eine vom Effektniveau abhängige *Varianzstruktur* vorliegt, so daß die Beobachtungsvariabilitäten von unterschiedlichen Konzentrationen sich zwar unterscheiden können, aber nicht unabhängig voneinander sind. Beobachtungsvarianzen von benachbarten Effekten müssen folglich ähnlich groß sein. Kann diese Varianzstruktur beschrieben bzw. geschätzt werden, so sind zwar bedeutend weniger Replikate pro eingesetzte Substanzkonzentration erforderlich (minimal 3), dafür müssen Effektvarianzen aber über den gesamten Effektbereich beobachtet und bestimmt werden.

In Abbildung C2.1 sind typische Varianzstrukturen dargestellt, wie sie in den Toxizitätstestungen beobachtet worden sind. Hierbei ist in Abhängigkeit vom mittleren, beobachteten Effekt die entsprechende Varianz aufgetragen. Darüber hinaus ist jeder Datenpunkt in der Abbildung mit der dahinterstehenden Anzahl von Replikaten gekennzeichnet. Für steile Konzentrations-Wirkungsbeziehungen ist die Unsicherheit in den Beobachtungen des mittleren Effektbereiches am größten (vgl. Abbildung *a* und *b* als typische Beispiele steiler Konzentrations-Wirkungskurven), während bei Substanzen mit weniger steilen Konzentrations-Wirkungskurven unabhängig vom Testsystem vor allem größere Variabilitäten im unteren Effektbereich beobachtet wurden (siehe *d*). Es gab aber auch Datensätze, die gar keine Varianzstruktur erkennen ließen (siehe *c*). Da auf Grund der unterschiedlichen Varianzmuster a priori eine universelle Beschreibung der Beziehung zwischen dem Effektniveau und dessen Varianz über ein Modell nicht möglich war, wurde auf einen parametrischen Ansatz verzichtet.

Eine Möglichkeit, die Variabilität der beobachteten Effekte (im folgenden kurz Beobachtungsvariabilität) in Abhängigkeit vom mittleren Effekt glättend zu modellieren, bot sich in der Anwendung von nichtparametrischen Splineschätzungen an (Reinsch 1967). Da das kubische Splineverfahren standardmäßig im Statistikprogramm SAS/IML (1996) integriert ist (IML-Module *SPLINEC* und *SPLINEV*), wurde die Prozedur übernommen und an die verallgemeinerte Schätzmethode der gewichteten kleinsten Quadrate angepaßt. Hierbei boten sich zwei bereits implementierte Vorteile an:

- Die beobachtete Variabilität der Replikate geht über die Anzahl der entsprechenden Beobachtungen gewichtet in die Splineglättung ein, d.h. die Replikatenvariabilität von beispielsweise 6 Messungen einer Konzentration erhält so ein höheres Gewicht, als wenn nur 3 Replikate vorliegen.
- Es lassen sich über Interpolationen auch Schätzungen für Konzentrationen durchführen, für die weniger als 3 Meßwerte vorliegen. Nicht möglich sind dagegen Extrapolationen, d.h. die höchste eingesetzte Konzentration (=maximaler Effekt) sollte immer in mindestens drei Replikaten vorliegen.

Als geeignet erweist sich hierbei eine vorab zu wählende Glättungskonstante von $K=0.02$, welche den Grad der Splineglättung bestimmt. Um über diese Modellierung durchaus

mögliche negative bzw. zu kleine Splineschätzungen zu vermeiden, wurde eine positive Schranke von 1 % Effekt eingebaut, d.h. es wird unabhängig vom Effektniveau immer von einer Minimalvarianz von 1 % ausgegangen. Da davon ausgegangen wurde, daß ein stetiger Übergang von der Varianz der Kontrollen zur Variabilität der Effekte kleinster Konzentrationen vorliegt, wurde die Kontrollvariabilität¹ in die Varianzschätzung integriert.

An einem Beispiel zur Algen-Toxizität von Terbutryn soll das Prinzip dieser Gewichtsschätzung verdeutlicht werden. In Abbildung C2.2 ist der durch das Regressionsmodell geschätzte mittlere Effekt (*Generalisierter Logit*) gegen die Beobachtungsvariabilität aufgetragen. Auffällig ist die mit steigendem Effekt zunehmende Variabilität in den Messungen, die dann im Bereich des maximalen Effektes stark abnimmt. Die ebenfalls in der Abbildung dargestellte Splineschätzung der Beobachtungsvarianz gibt diesen Verlauf geglättet wieder, so daß die hieraus geschätzten Gewichtungen im Effektbereich von

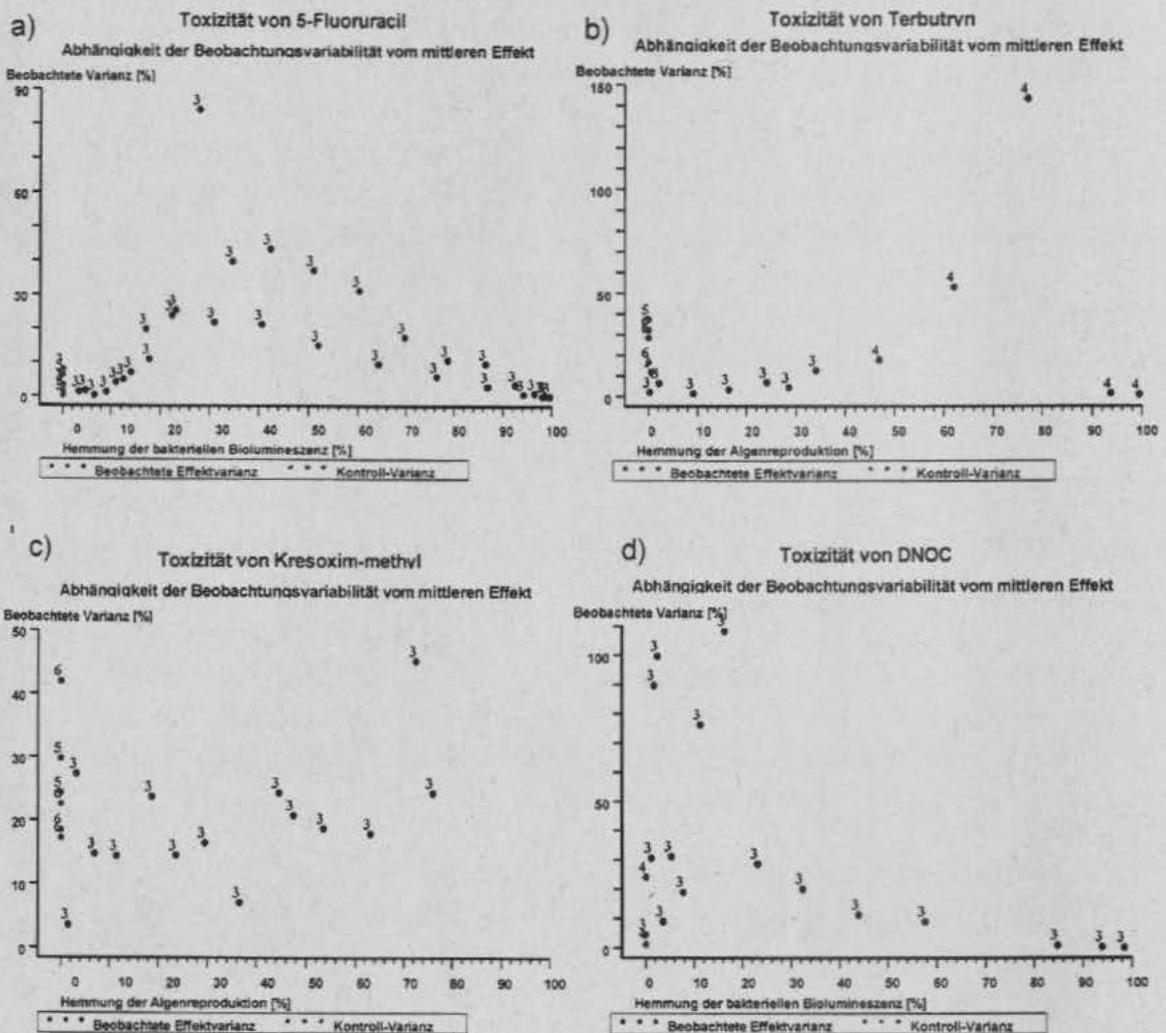
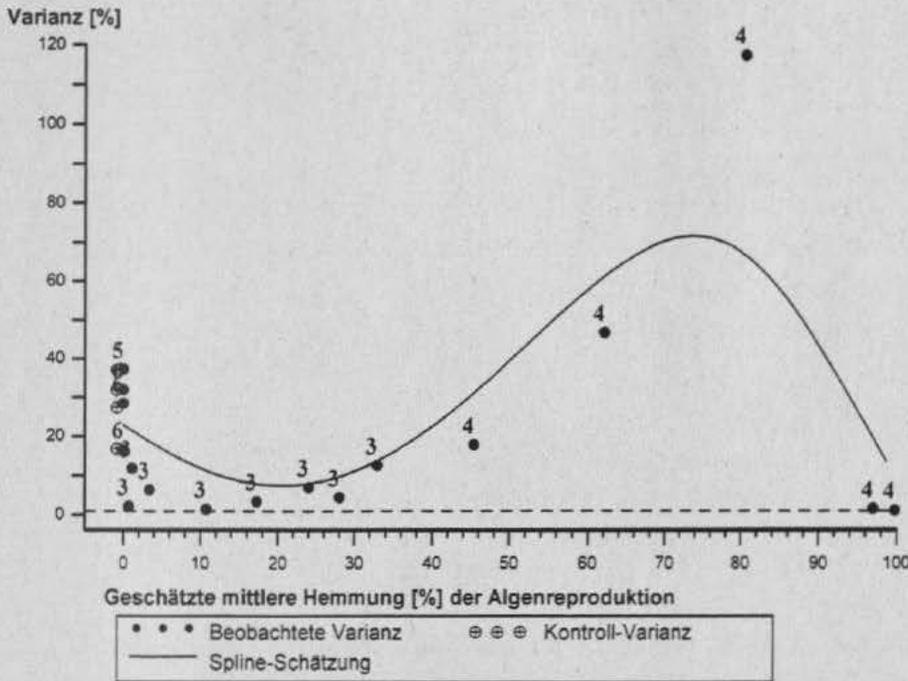


Abb. C2.1: Abhängigkeit der Beobachtungsvariabilität vom Effektniveau am Beispiel ausgewählter Toxizitätsdaten im Algen- und Leuchtbakterientest.

¹ Da die Kontrollvariabilitäten jeder Paralleltastung gesondert vorlagen, wurden sie unabhängig voneinander in die Gewichtsschätzung für das 0 % Effektniveau aufgenommen.



Hinweis: Ziffern an den Datenpunkten bezeichnen die Anzahl der Meßwerte

Abb. C2.2: Schätzung der Beobachtungsvariabilität über kubische Splineverfahren am Beispiel der Algentoxizität von Terbutryn.

70 % um ca. 1/8 kleiner sind als entsprechende Gewichtungen im unteren Effektbereich.

In Abbildung C2.3 sind die Modellanpassungen des *Generalisierten Logit* und die entsprechenden 95 %-Konfidenzbereiche dargestellt, jeweils bestimmt über zwei unterschiedliche Schätzverfahren: Hierbei wird deutlich, daß das ungewichtete Minimale-Quadrate-Schätzverfahren (a) Unsicherheitsbereiche gleicher Breite für jede Effektschätzung liefert. In diesem Beispiel wird somit ein zu großer Konfidenzbereich für kleine Effekte geschätzt. Dies steht im Widerspruch zu den experimentellen Daten. Dies wird über die verallgemeinerte Methode der gewichteten kleinsten Quadrate korrigiert (b).

Die aus den beiden Schätzverfahren resultierenden Modellanpassungen unterscheiden sich in diesem Beispiel dabei nur unwesentlich, wie aus den fast identischen Kurvenverläufen der geschätzten Effekte ersichtlich ist. Das heißt, unterschiedliche Schätzverfahren können zwar zu gleichen Modellanpassungen führen, sich aber in der Einschätzung ihrer Unsicherheit wesentlich unterscheiden.

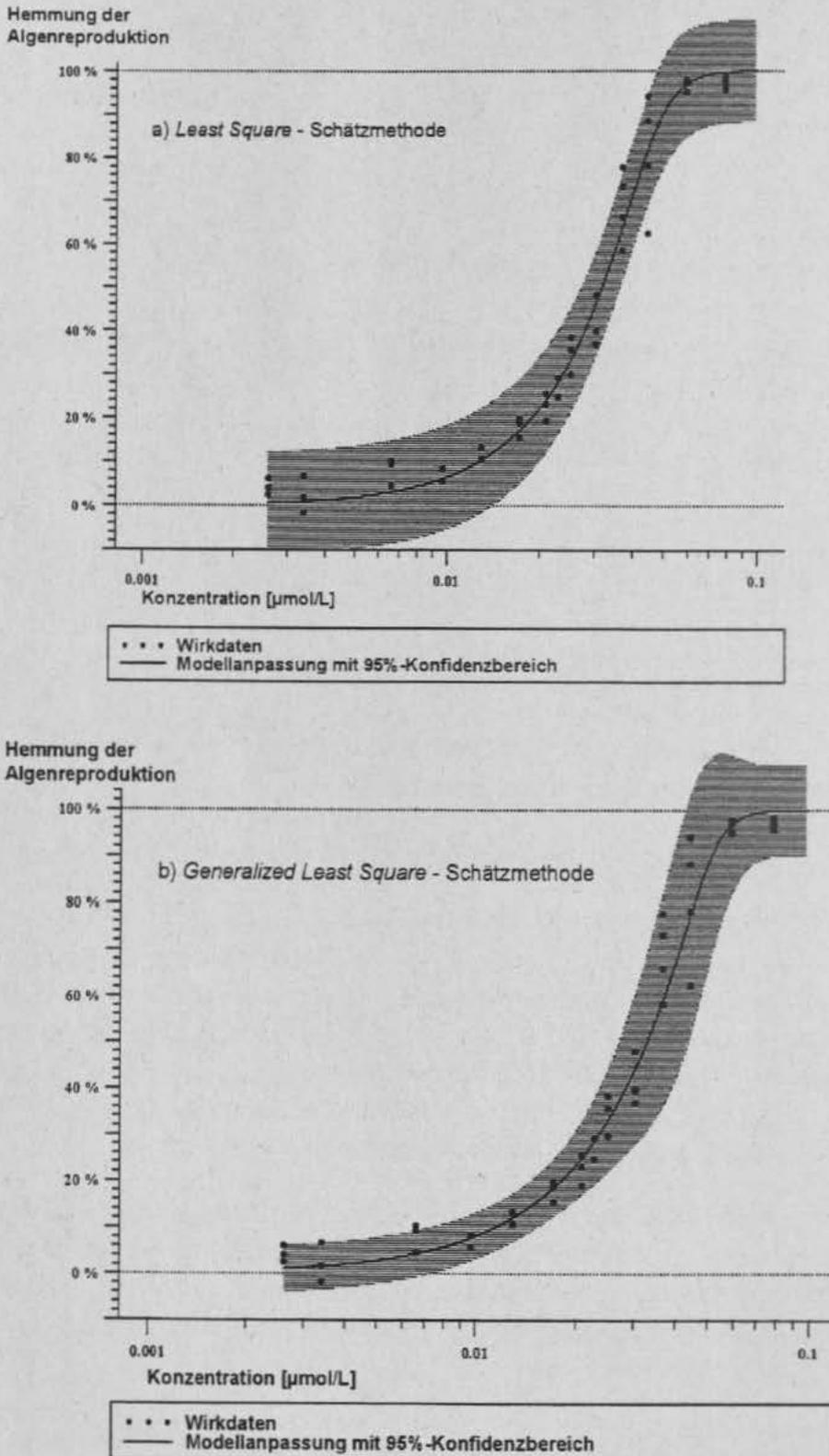


Abb. C2.3: Anpassung des Regressionsmodells (*Generalisierter Logit*) über
 (a) ungewichtete Minimale-Quadrate-Schätzung und
 (b) verallgemeinerte ungewichtete Minimale-Quadrate-Schätzung
 am Beispiel von Algentoxizitätsdaten (Wirksubstanz: Terbutryn).

Outlierbehandlung

In der experimentellen Praxis kommt es durchaus vor, daß einzelne Beobachtungen nicht dem Konzentrations-Wirkungsverlauf der übrigen Beobachtungen entsprechen. Diese Werte werden i.a. als *Outlier* bezeichnet, da sie als seltene, aber mögliche Beobachtungen nicht begründet aus dem Experiment ausgeschlossen werden können. Für die Schätzmethode über die Minimierung der Abweichungsquadrate hat es zur Folge, daß diese Beobachtungen sehr große Residuenwerte verursachen und somit im Verhältnis zu den übrigen Beobachtungen zu sehr den Schätzalgorithmus dominieren. Zwar wird über die Gewichtungen dies etwas relativiert, da die entsprechende Beobachtungsvariabilität entsprechend höher und somit die Abweichungsquadrate mit einem kleinem Gewicht versehen werden, aber nichtsdestotrotz führen sie zu Verzerrungen in den Schätzungen der Modellparameter und der Varianzstruktur.

Um dies zu vermeiden, wurde unabhängig vom Minimumskriterium bei der Modellbildung ein zusätzliches Robustheitskriterium eingeführt, das von Huber (1981) erstmals erwähnt worden ist und als *metrische Winsorisierung der Daten* bezeichnet wird (siehe auch Staudte und Sheater 1990). Die Idee hierbei ist, daß Beobachtungen, die weit entfernt von der Modellerwartung sind, im Schätzprozeß unter definierten Bedingungen durch künstliche Werte ersetzt werden. Die Bedingung dieser *Winsorisierung* ergibt sich aus der gesamten Beobachtungsvariabilität und der Entscheidung, inwieweit diese künstliche Beobachtung im Schätzprozeß als realistisch zugelassen werden soll (z.B. als 1 %-Perzentilwert der Normalverteilung). Die Beobachtungen wurden in diesem Vorhaben neu definiert genau dann, wenn folgendes Kriterium zutrif:

$$\text{Beobachtung}_i^* = \begin{cases} \text{Beobachtung}_i, & \text{falls } |r_i| \leq k * s_i \\ \text{Erwartung}_i + \text{sign}(r_i) * k * s_i, & \text{sonst} \end{cases}$$

Hierbei entspricht $r_i = y_i - \hat{y}_i$ dem einfachen Residuum der *i*-ten Beobachtung, s_i der aktuellen Schätzung des Standardfehlers des *i*-ten Residuum r_i und k einer positiven Tuningkonstante ($1 \leq k$). Diese Konstante reguliert den Grad der gewünschten Robustheit und sollte nicht zu klein gewählt werden, da die Beobachtungen im Schätzprozess an die Erwartung zu nah „herangeholt“ werden können, was zu inkonsistenten Schätzungen der Erwartungswerte und deren Unsicherheit (Kovarianzmatrix) führen kann. Während Altenburg (1990, 1994b) für quantale Daten aus dem Bereich der Immunoassays einen Wert von $K \approx 1.6$ empfiehlt, zeigte sich in den vorliegenden aquatischen Toxizitätsdaten eine Konstante $K=2$ als geeignetes Maß für eine metrische Winsorisierung der Daten. Beobachtungen, deren absolutes Residuum mehr als doppelt so groß wie der des Standard-Residuumfehlers ist, wurden somit im Schätzprozeß winsorisiert.

An einem konkreten Datenbeispiel (Hemmung der Algenreproduktion durch Neburon) mit 45 Wirkdaten soll der Einfluß einer typischen *Outlier*-Beobachtung demonstriert werden: Bei einer Substanzapplikation von $0.0096 \mu\text{mol/L}$ Neburon wurde eine 5%ige Förderung der Algenreproduktion (= negativer Hemmwert) beobachtet, obwohl parallel eingesetzte gleiche Konzentrationen deutliche hemmende Effekte aufweisen. In Abbildung C2.4 (a) ist die Regressionsanpassung des Weibull-Modells mit entsprechendem 95 %-Konfidenz-

intervall auf Grundlage der verallgemeinerten Schätzmethode der kleinsten gewichteten Quadrate dargestellt. Hier zeigt sich im unteren Effektbereich ein zu großer Unsicherheitsbereich der Erwartungsschätzung. Durch die Winsorisierung der Daten ergeben sich für die Erwartungswerte keine relevanten Veränderungen, hingegen für die Schätzung der Unsicherheit im unteren Effektbereich ein um bis zu ca. 1/3 kleinerer 95%-Konfidenzbereich (b). Hierbei wird die beobachtete Hemmung von -5% der *Outlier*-Beobachtung auf +6% in der letzten Iteration des Schätzprozesses gesetzt. An diesem Beispiel wird die Empfindlichkeit von Minimale-Quadrate-Schätzungen gegenüber einer einzigen *Outlier*-Beobachtung selbst bei großen Datensätzen besonders verdeutlicht.

Dieses Verfahren ist auch gegenüber mehreren *Outlier*-Beobachtungen in einem Experiment robust, wobei die Schranke einer Winsorisierung über die Schätzung des Residuum-Standardfehlers automatisch heraufgesetzt wird und somit nicht in Konflikt mit einer tatsächlich erhöhten Variabilität in den Beobachtungen kommt.

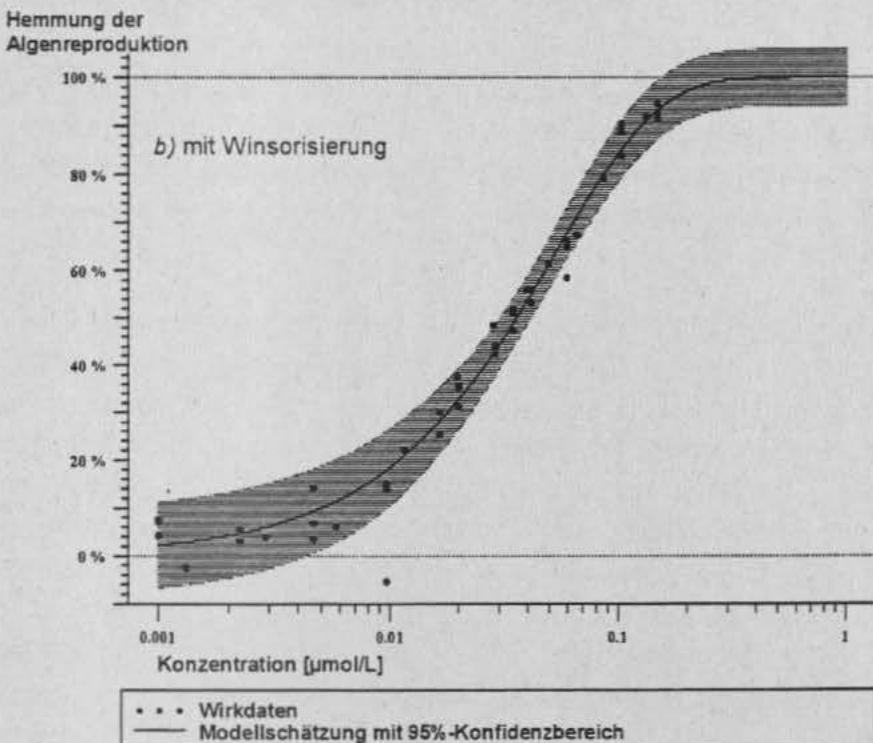
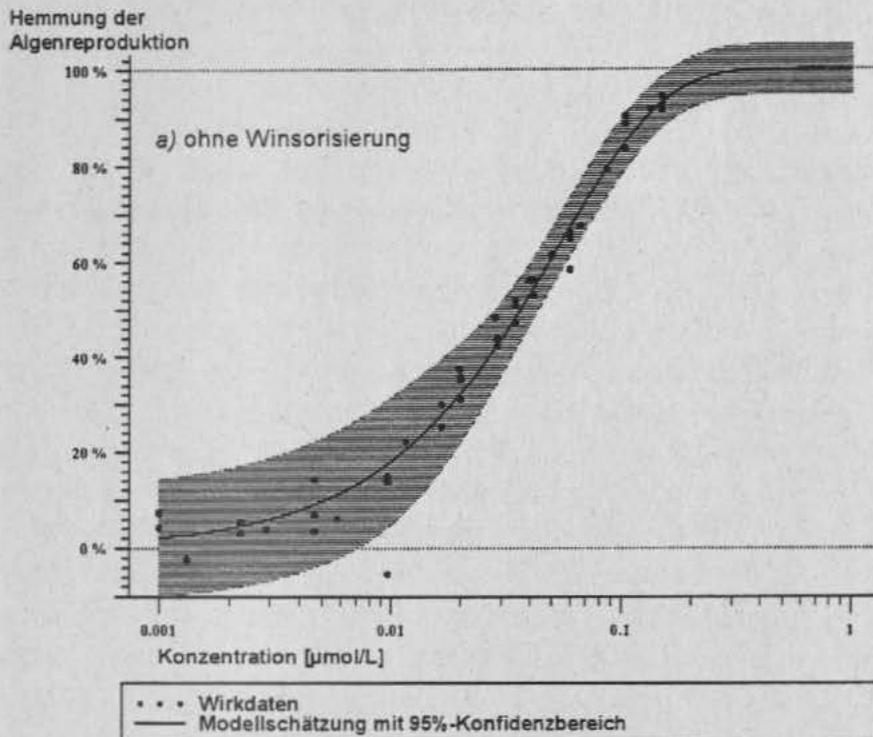


Abb. C2.4: Anpassung des Regressionsmodells (Weibull) über die verallgemeinerte Schätzmethode der kleinsten Quadrate am Beispiel der Algentoxizität von Neburon
a) ohne Winsorisierung und
b) mit Winsorisierung.

Anhang C3 Bestimmung der Unsicherheit von Effektkonzentrationen über Bootstrapverfahren

Das Grundprinzip von Resampling-Verfahren ist in Abbildung C3.1 dargestellt. Um die erwartete Toxizität einer Substanz für einen Organismus über die Kennzahl einer definierten Effektkonzentration anzugeben, wird auf Grundlage eines Experiments diese Kenngröße geschätzt. Hierfür ist die Kenntnis eines Modells erforderlich. Da die Güte der Schätzung nur in Verbindung mit deren Unsicherheit beurteilt werden kann, ist die Bestimmung dieser statistischen Unsicherheit über Konfidenzbereiche oder Varianzen unbedingt notwendig, um so Rückschlüsse über das Experiment hinaus zu machen. Normalerweise kann diese Unsicherheit über Verteilungsannahmen der interessierenden Kenngröße sofort über die experimentelle Variabilität bestimmt werden. Ist dies wegen der Komplexität der Kenngröße nicht möglich (z.B. als Reduktion vieler zufälliger Parameter), so kann über Resampling-Verfahren (Bootstrap, Jackknife) eine Abschätzung gewonnen werden. Hierbei wird auf Grundlage der beobachteten Toxizitätsdaten ein neuer Datensatz simuliert, der so auch hätte beobachtet werden können. An diese simulierten Daten wird das gleiche Modell erneut angepaßt, so daß daraus die definierte Effektkonzentration geschätzt werden kann, die sich von der ursprünglich berechneten unterscheiden kann und somit dann weniger wahrscheinlich, aber realistisch ist. Wird dieser Simulationsvorgang unabhängig voneinander hinreichend oft wiederholt, so erhält man viele simulierte, aber unterschiedliche Effektkonzentrationsschätzungen, die insgesamt eine Verteilung ergeben. Diese Verteilung entspricht gerade der gesuchten Unsicherheitsverteilung der aus den Originaldaten geschätzten Effektkonzentration, so daß sich Varianzen bzw. Konfidenzbereiche sofort bestimmen lassen (Efron und Tibshirani 1993, Shao und Tu 1995).

Die Resampling-Verfahren selbst unterscheiden sich nur in der Verfahrensweise für die Entwicklung der simulierten Daten. Da das im Verhältnis zum Jackknife-Verfahren rechnerintensivere Bootstrapverfahren generell zu stabileren Schätzungen führt, wurde immer dieses Prinzip gewählt. Hierbei entsprechen die simulierten Daten dem Originaldatensatz exakt mit dem Unterschied, daß jeder reale, beobachtete Effekt ersetzt wird durch einen simulierten. Diese Bootstrap-Beobachtung wird auf Grundlage der geschätzten Beobachtungsvariabilität (vgl. Anhang C2) neu „ausgewürfelt“ über einen normalverteilten Zufallsgenerator (vgl. Rosen und Cohen 1995). Der Erwartungswert des Zufallsgenerators ist dabei die geschätzte mittlere Modellerwartung. Eine kleine beobachtete Variabilität im Originalexperiment muß so zu ähnlichen simulierten Beobachtungen führen.

Die Präzision der simulierten Verteilung hängt neben Grundannahmen (repräsentatives Experiment mit unabhängigen Beobachtungen, erwartungstreue Modellwahl) vor allem von der Anzahl von Simulationen ab. Je seltenere Ereignisse der Verteilung geschätzt werden sollen (z.B. Perzentile des 95 %-Konfidenzbereichs), desto mehr Simulationen sollten erfolgen ($N > 5000$), um validere Schätzungen zu erhalten (Efron und Tibshirani 1993, Shao und Tu 1995). Da diese Fallzahlen in der Regel einen zu großen rechnerischen Aufwand bedeuten würden, können über geeignete Transformationen der gesamten Simulationsverteilung stabilere Schätzungen über diese Perzentile bestimmt

werden (Efron und Tibshirani 1993, Bickel und Krieger 1989). Hierbei wurde auf die BC-Methode zurückgegriffen, welche eventuelle Unterschiede zwischen der aus den Beobachtungsdaten geschätzten Effektkonzentration und dem Gipfel (Erwartungswert) der Bootstrapverteilung korrigiert. In diesem Projekt wurden für die Berechnung von Bootstrap-Konfidenz-Intervallschätzungen immer mindestens 1000 Simulationen durchgeführt. Nachfolgend wird die Verfahrensweise formalisiert.

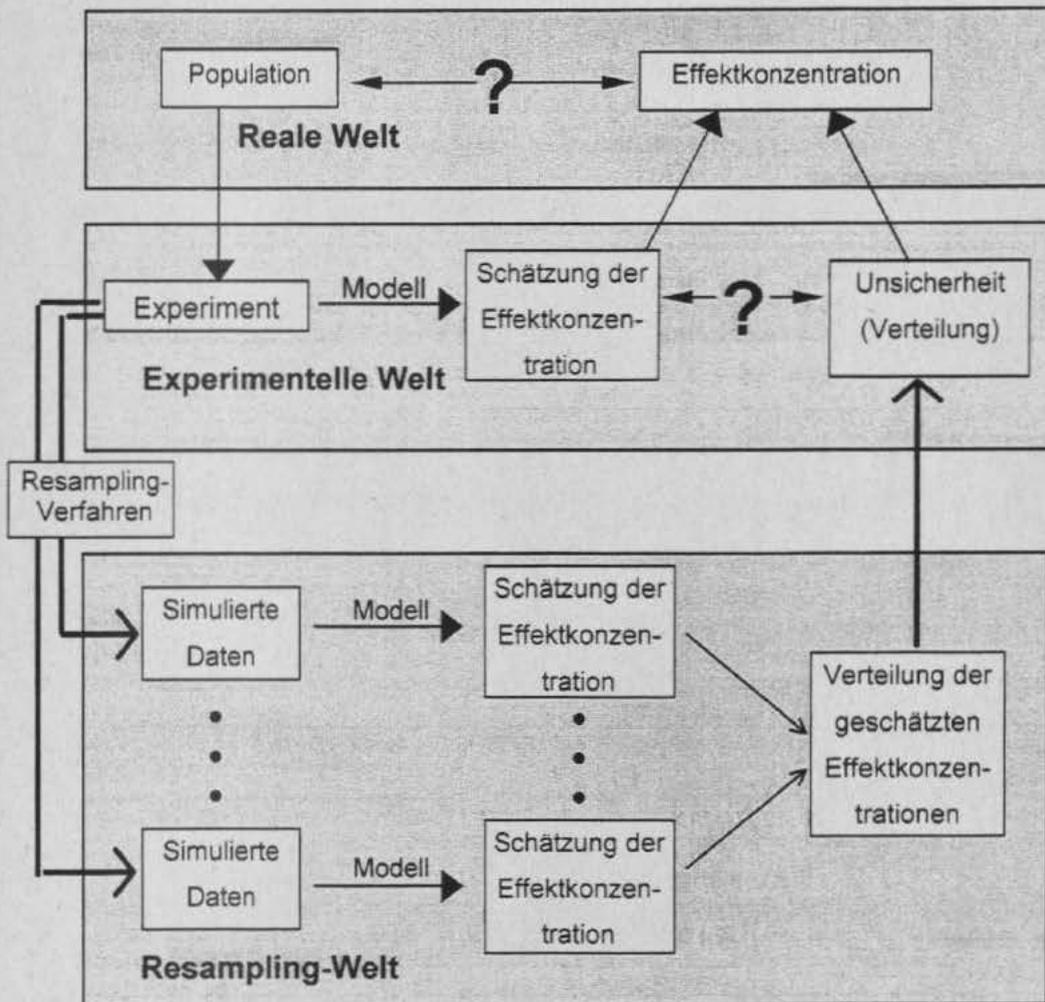


Abb. C3.1: Konfidenzbereichsschätzungen von Effektkonzentrationen am Beispiel von Resampling-Verfahren

Sei f das Regressionsmodell, welches den Zusammenhang zwischen den applizierten Substanzkonzentrationen x_i und den beobachteten Effekten Y_{ij} (Konzentrationsstufe $i=1, \dots, k$, Replikat $j=1, \dots, n_i$) beschreibt, und θ der Vektor der unbekannt, zu schätzenden Modellparameter. Die Funktionsvorschrift des Regressionsmodells lautet dann

$$Y_{ij} = f(x_{ij}, \theta) + e_{ij},$$

wobei die Fehler e_{ij} (Residuen) identisch und unabhängig normalverteilt sind mit einem Erwartungswert $E(e_{ij})=0$ und einer Varianz $\text{Var}(e_{ij})=\sigma_i^2$ (Varianzheterogenität).

Ziel ist es dann, für die „wahre“, unbekannte Effektkonzentration x_0 eine Anzahl von B Bootstrap-Schätzern $\hat{x}_0^{*(1)}, \dots, \hat{x}_0^{*(B)}$ zu erzeugen und daraus ein $(1-2\alpha)$ -Konfidenzbereich zu bilden (i.a. $\alpha=2.5\%$). Die Prozedur sieht im Einzelnen wie folgt aus:

1. Über die beobachteten Daten werden die Modellparameter geschätzt: $\hat{f}(x) = f(x, \hat{\theta})$
2. Hieraus läßt sich die Schätzung der Effektkonzentration ableiten: $\hat{x}_0 = \hat{f}^{-1}(Y_0)$
3. Erzeugen der Bootstrap-Samples $b=1, \dots, B$ bzw. der Bootstrap-Replikate $\hat{x}_0^{*(b)}$:

(i) Erzeugen von Effekten: $Y_{ij}^{*(b)} = \hat{f}^{-1}(x_i) + e_{ij}^{*(b)}$, $e_{ij}^{*(b)} \cong N(0, s_i^2)$.

Die Beobachtungsvarianz s_i^2 wird automatisch über die gewichtete Splineschätzung im Schätzverfahren (*Generalized Least Square*) bestimmt.

(ii) Modell-Schätzung von $\hat{f}^{*(b)}(x)$ auf Grundlage der Datenpaare $(x_i, Y_{ij}^{*(b)})$, $i = 1, \dots, k$, $j = 1, \dots, n_i$

(iii) Konzentrationsschätzung: $\hat{x}_0^{*(b)} = \hat{f}^{*(b)-1}(Y_0^{*(b)})$.

4. Bestimmung eines $(1-2\alpha)$ -Konfidenzbereiches (z.B. 95%) für \hat{x}_0 : $[\hat{x}_0(\alpha), \hat{x}_0(1-\alpha)]$.
Sei F^* die kumulative Bootstrap-Verteilungsfunktion von \hat{x}_0^* mit

$$F^*(x) = [\#(\hat{x}_0^{*(b)} \leq x)] / B$$

Eine Bias-Korrektur zur Stabilisierung der Verteilung wird über das BC-Verfahren („*bias corrected*“) durchgeführt, so daß der Konfidenzbereich bestimmt wird als

$$[\hat{x}_0(\alpha), \hat{x}_0(1-\alpha)] = [F^{*-1}(\Phi(2\hat{z}_0 + z_\alpha)), F^{*-1}(\Phi(2\hat{z}_0 + z_{1-\alpha}))] \quad (\text{BC-Intervall}),$$

wobei Φ der Verteilungsfunktion der Standard-Normalverteilung mit $\Phi(z_\alpha) = \alpha$ und $\Phi(z_{1-\alpha}) = 1-\alpha$ entspricht. Hierbei muß der Parameter \hat{z}_0 bestimmt werden. Falls \hat{z}_0 Null ist, dann liegt ein einfaches Perzentil-Intervall vor. Dieser Parameter ändert die Perzentilwerte, welche die Schranken des BC-Intervalls festsetzen, und korrigiert einen möglichen Bias des rohen Perzentil-Intervalls. Der Wert \hat{z}_0 zur Bias-Korrektur kann direkt als

$$\hat{z}_0 = \Phi^{-1}(F^*(\hat{x}_0)) = \Phi^{-1}([\#(\hat{x}_0^{*(b)} \leq \hat{x}_0)] / B)$$

bestimmt werden und mißt den Median-Bias der \hat{x}_0^* bzw. die normierte Differenz der Mediane von \hat{x}_0^* und \hat{x}_0 , d.h. $z_0=0$, falls der Median aller Bootstrap-Replikate $\hat{x}_0^{*(b)}$ exakt der aus den Beobachtungsdaten geschätzten Effektkonzentration \hat{x}_0 entspricht.

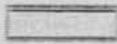
Diese im Prinzip einfache Methode zur Stabilisierung der Replikatenverteilung setzt eine symmetrische Verteilung voraus. Liegen geringe Abweichungen vor, so sind die entsprechende Konfidenzbereichsschätzungen leicht verzerrt. Inwieweit die hierfür von Efron und Tibshirani (1993) empfohlene, vergleichsweise komplexere BC_α - oder ABC-Methode anwendbar ist, muß zukünftig noch gezeigt werden.

Anhang D: Konzentrations-Wirkungsdaten

In diesem Anhang werden die beobachteten Toxizitätsdaten aller im Gemisch verwendeten Einzelsubstanzen und aller Gemischttestungen in Konzentrations-Wirkungs-Abbildungen dokumentiert. Darüber hinaus ist das regressionsanalytisch bestimmte *best fit* Modell abgebildet sowie alle hieraus ermittelten relevanten Toxizitätsdaten. Insgesamt gliedert sich dieser Abbildungsanhang in zwei Bereiche:

- D1 Konzentrations-Wirkungsdaten der Einzelsubstanzen (Seite 236)
- D2 Konzentrations-Wirkungsdaten der Gemische (Seite 302)

Da alle Abbildungen im selben Format und Layout gestaltet sind, werden sie nachfolgend erläutert. Für die in der Graphik verwendeten Symbole und schraffierten Flächen gilt:

- In der experimentellen Testung beobachtete Wirkdaten
- * In der experimentellen Testung eingesetzte Kontrollen
-  95 %-Konfidenzbereich des Kontrollmittelwertes, zur besseren Beurteilung der beobachteten Wirkdaten über den gesamten Konzentrationsbereich dargestellt
-  Kurvenverlauf der Modellerwartung: Das *best fit* Regressionsmodell ist einschließlich der geschätzten Modellparameter in der 3. Titelzeile angegeben.
-  95%-Perzentilbereich der Beobachtungsvariabilität, geschätzt über die Schätzmethode der verallgemeinerten Minimale-Quadrate-Schätzung.

Die wichtigsten Effektkonzentrationen (EC_{01} , EC_{10} , EC_{50} , EC_{90}) sind sowohl in der Graphik angegeben als auch textlich dokumentiert. Ihre über Bootstrap-Verfahren geschätzte Unsicherheit (95 %-Konfidenzintervall) ist zusätzlich (in Klammern) angeführt, alle Werte sind dabei sowohl in $\mu\text{mol/L}$ als auch in mg/L angegeben (Ausnahme: Gemischttestungen). Dies gilt ebenfalls für die mit dem *DUNNETT*-Test bestimmten NOEC und LOEC-Werte. Um die Steilheit unterschiedlicher Modellkurven besser vergleichen zu können, sind als Verhältnisse zwischen Effektkonzentrationen zwei verschiedene Steilheitskriterien angegeben:

EC_{01}/EC_{50} : Beschreibt den relativen Abstand zwischen der EC_{01} und der EC_{50} und vermittelt somit einen Eindruck über die Steilheit der Modellkurve im Niedrigeffektbereich.

EC_{10}/EC_{90} : Beschreibt den relativen Abstand zwischen der EC_{10} und der EC_{90} und vermittelt somit einen Eindruck über die Steilheit der Modellkurve im mittleren Effektbereich.

Anhang D1: Konzentrations-Wirkungsdaten der Einzelsubstanzen

Anhang D1.1: Algentoxizität der 18 Substanzen *ähnlicher* Wirkung (*s*-Triazine)

Substanz	Seite	Substanz	Seite
Ametryn.....	238	Prometryn.....	247
Atraton.....	239	Propazin.....	248
Atrazin.....	240	Sebuthylazin.....	249
Cyanazin.....	241	Secbumeton.....	250
Desmetryn.....	242	Simazin.....	251
Dimethametryn.....	243	Simetryn.....	252
Dipropetryn.....	244	Terbumeton.....	253
Methoprotryn.....	245	Terbuthylazin.....	254
Prometon.....	246	Terbutryn.....	255

Anhang D1.2: Algentoxizität der 16 Substanzen *unähnlicher* Wirkung

Substanz	Seite	Substanz	Seite
Aclonifen.....	256	Metalaxyl.....	264
8-Azaguanin.....	257	Metazachlor.....	265
Azaserin.....	258	Metsulfuron-methyl....	266
CCCP.....	259	Nalidixinsäure.....	267
Chloramphenicol.....	260	Norflurazon.....	268
Dodecyltrimethyl- ammoniumchlorid.....	261	Paraquat.....	269
Fenfuram.....	262	Terbuthylazin.....	270
Kresoxim-methyl.....	263	Triadimenol.....	271

Anhang D1.3: Bakterientoxizität der 16 Substanzen *ähnlicher* Wirkung (Entkoppler)

Substanz	Seite	Substanz	Seite
CCCP.....	272	2,6-Dinitro-4-methylphenol..	280
Dinoseb.....	273	FCCP.....	281
Dinoterb.....	274	Pentachlorphenol.....	282
DNOC.....	275	4-Phenylazophenol.....	283
2,4-Dinitro-1-naphtol.....	276	2,3,4-Trichlorphenol.....	284
2,4-Dinitrophenol.....	277	2,3,5-Trichlorphenol.....	285
2,6-Dinitrophenol.....	278	2,3,6-Trichlorphenol.....	286
3,4-Dinitrophenol.....	279	2,4,6-Trichlorphenol.....	287

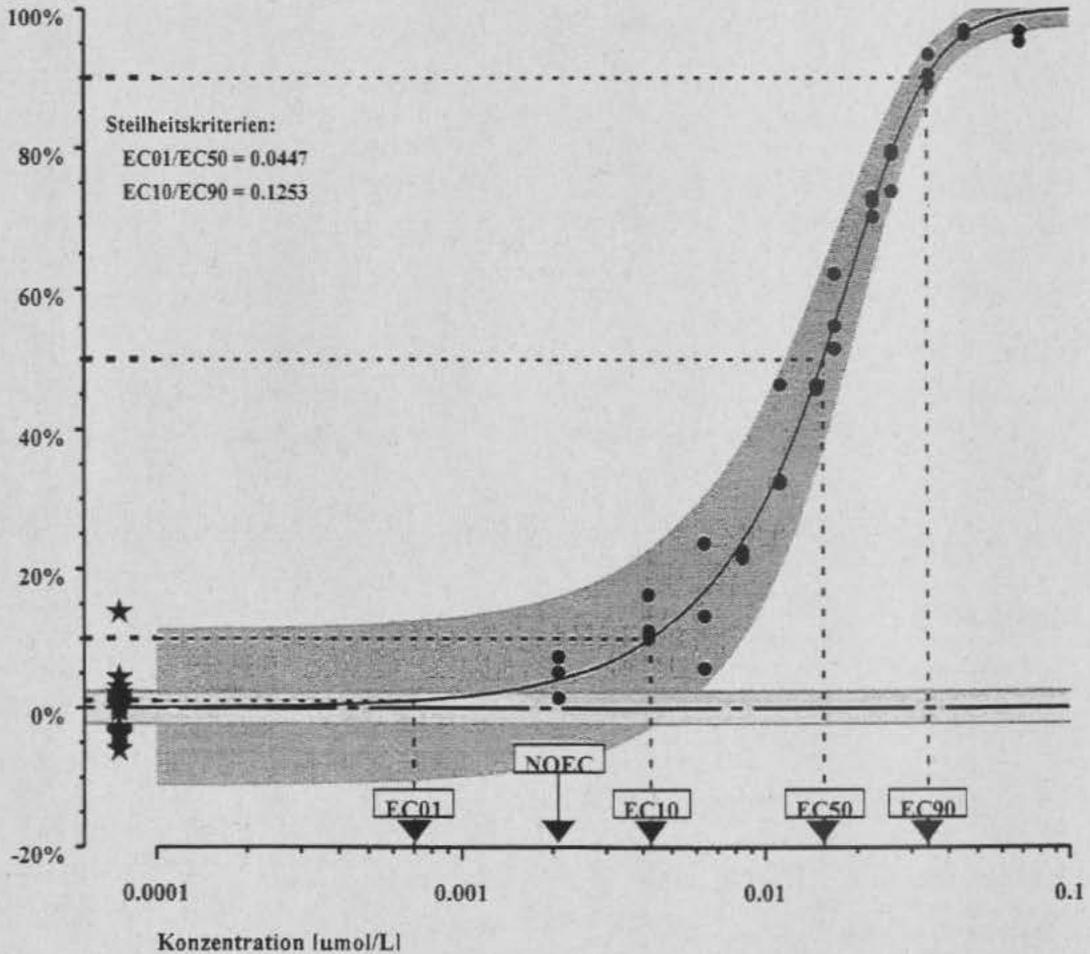
Anhang D1.4: Bakterientoxizität der 14 Substanzen *unähnlicher* Wirkung

Substanz	Seite	Substanz	Seite
Actinomycin.....	288	Dodecylpyridiniumbromid.....	295
Ampicillin.....	289	Ethacrynsäure.....	296
8-Azaguanin.....	290	5-Fluoruracil.....	297
Azaserin.....	291	Fusidinsäure.....	298
Chloramphenicol.....	292	Metalaxyl.....	299
Cycloserin.....	293	Nalidixinsäure.....	300
Diltiazem.....	294	Streptomycin.....	301

D1.1 Algentoxizität der 18 Substanzen *ähnlicher* Wirkung (s-Triazine)

Ametrvn

35 Wirkdaten und 18 Kontrollen

G.Logit: Wirkung= $1/(1+\exp(-(-13.680+8.627*(\log_{10}(\text{Konzentration}))))))^{**0.3402}$ Hemmung der
Algenreproduktion

● ● ● Substanz

★★★ Kontrollen

EC-Werte (umol/L): EC01 = 0.00070 (0.00027;0.00127) EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.00016 (0.00006;0.00029)

EC10 = 0.00426 (0.00295;0.00529)

EC10 = 0.00097 (0.00067;0.00120)

EC50 = 0.01564 (0.01464;0.01646)

EC50 = 0.00355 (0.00333;0.00374)

EC90 = 0.03401 (0.03245;0.03579)

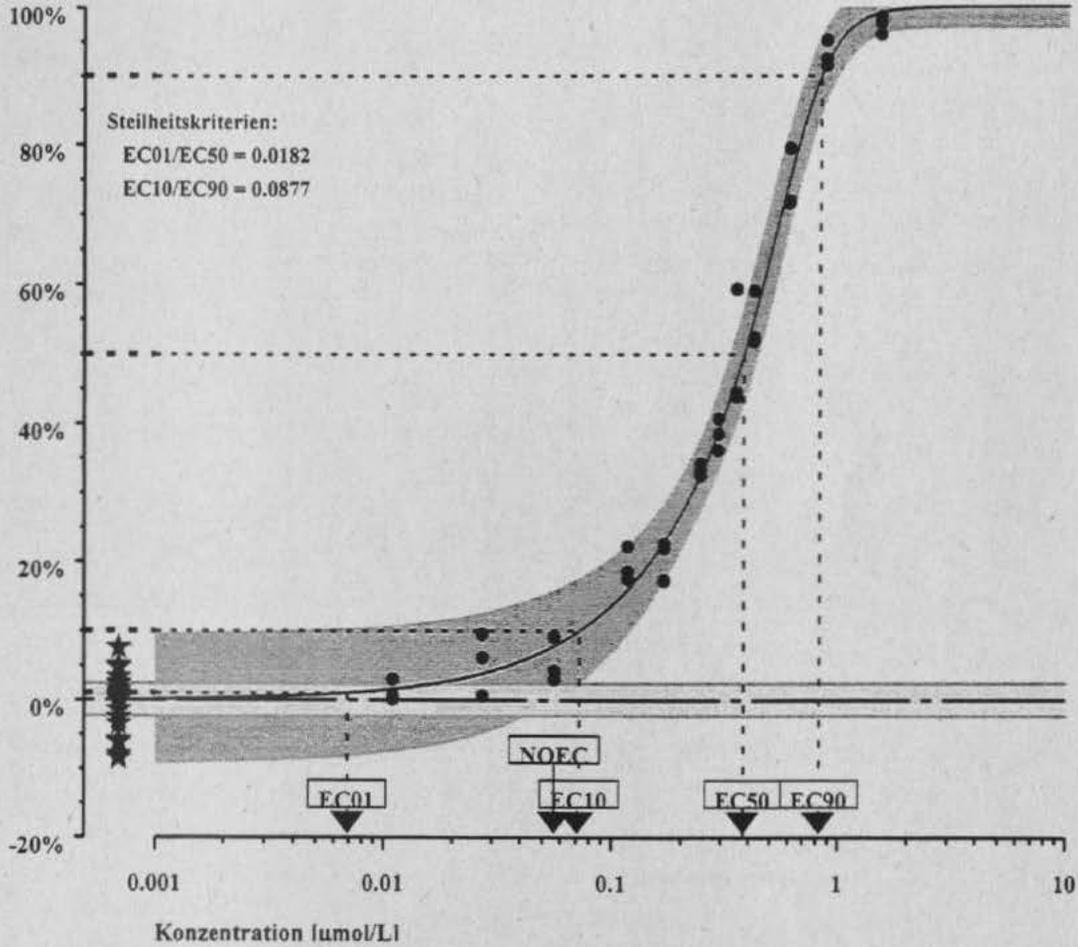
EC90 = 0.00773 (0.00738;0.00814)

NOEC = 0.0021 umol/L. LOEC = 0.0042 umol/L

NOEC = 0.00048 mg/L. LOEC = 0.00095 mg/L

Atraton

36 Wirkdaten und 18 Kontrollen

G.Logit: Wirkung= $1/(1+\exp(-1.304+11.063*(\log_{10}(\text{Konzentration}))))$ **0.2037Hemmung der
Algenreproduktion

● ● ● Substanz ★ ★ ★ Kontrollen

EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 0.00689 [0.00403:0.09993] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00146 [0.00085:0.02111]

EC10 = 0.07247 [0.05906:0.15505]

EC10 = 0.01531 [0.01248:0.03276]

EC50 = 0.37806 [0.32973:0.39518]

EC50 = 0.07987 [0.06966:0.08349]

EC90 = 0.82669 [0.76791:1.05763]

EC90 = 0.17466 [0.16224:0.22345]

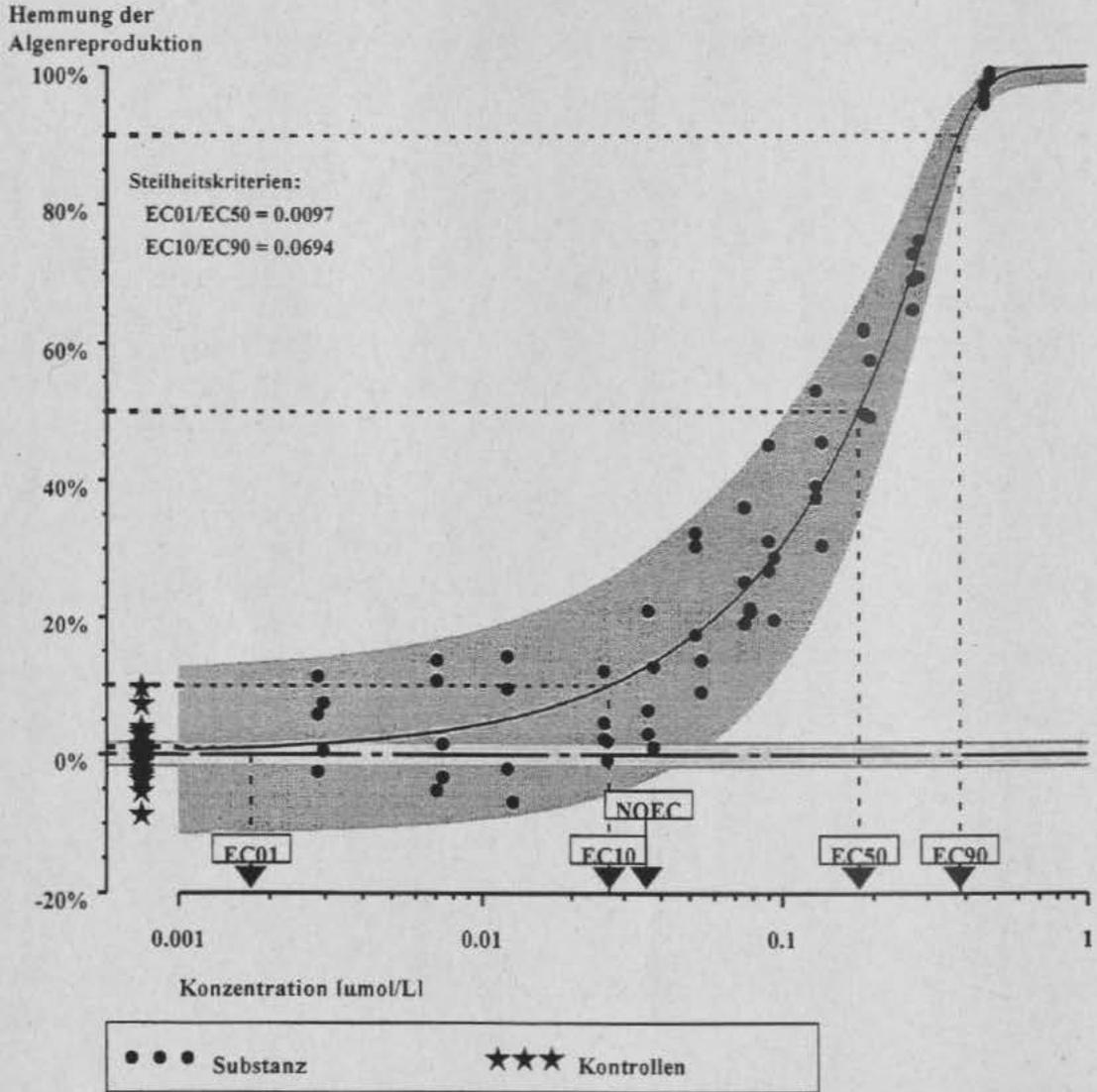
NOEC = 0.0565 µmol/L. LOEC = 0.1171 µmol/L

NOEC = 0.01194 mg/L. LOEC = 0.02474 mg/L

Atrazin

59 Wirkdaten und 24 Kontrollen

G.Logit: Wirkung=1/(1+exp(-(6.765+17.391*(log10(Konzentration)))))*0.1118



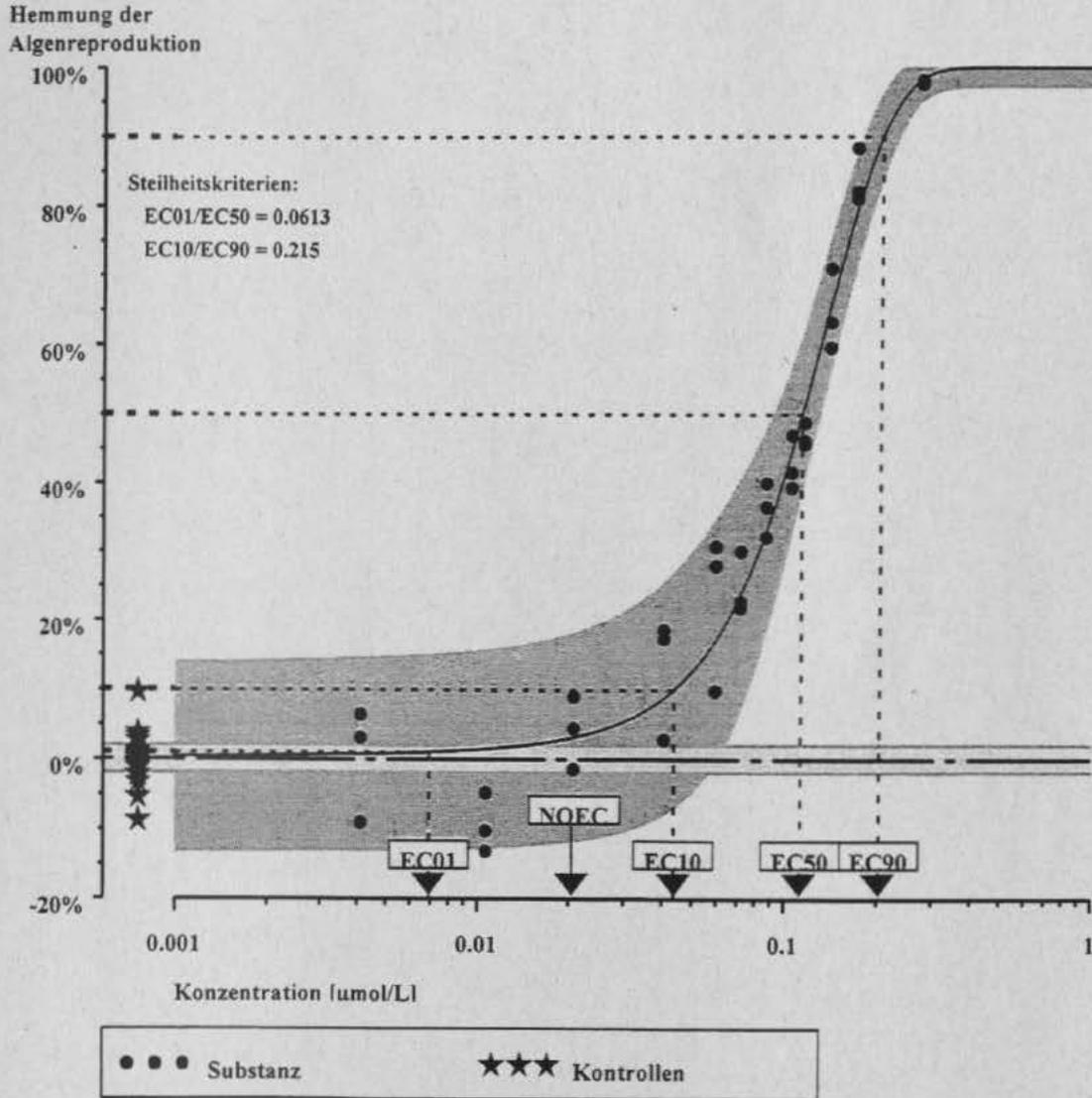
EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 0.00174 (0.00077:0.00319) EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00038 (0.00017:0.00069)
 EC10 = 0.02669 (0.01860:0.03463) EC10 = 0.00576 (0.00401:0.00747)
 EC50 = 0.17968 (0.16777:0.19315) EC50 = 0.03876 (0.03619:0.04166)
 EC90 = 0.38476 (0.36554:0.41038) EC90 = 0.08299 (0.07884:0.08851)

NOEC = 0.0364 µmol/L. LOEC = 0.0524 µmol/L NOEC = 0.00785 mg/L. LOEC = 0.01130 mg/L

Cyanazin

36 Wirkdaten und 18 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(8.640+7.404*(((Konzentration**0.6482)-1)/0.6482))



EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 0.00694 (<0.0001;0.02693) EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00167 (0.00000;0.00648)

EC10 = 0.04365 (0.03112;0.05496) EC10 = 0.01051 (0.00749;0.01323)

EC50 = 0.11316 (0.10843;0.11884) EC50 = 0.02724 (0.02610;0.02860)

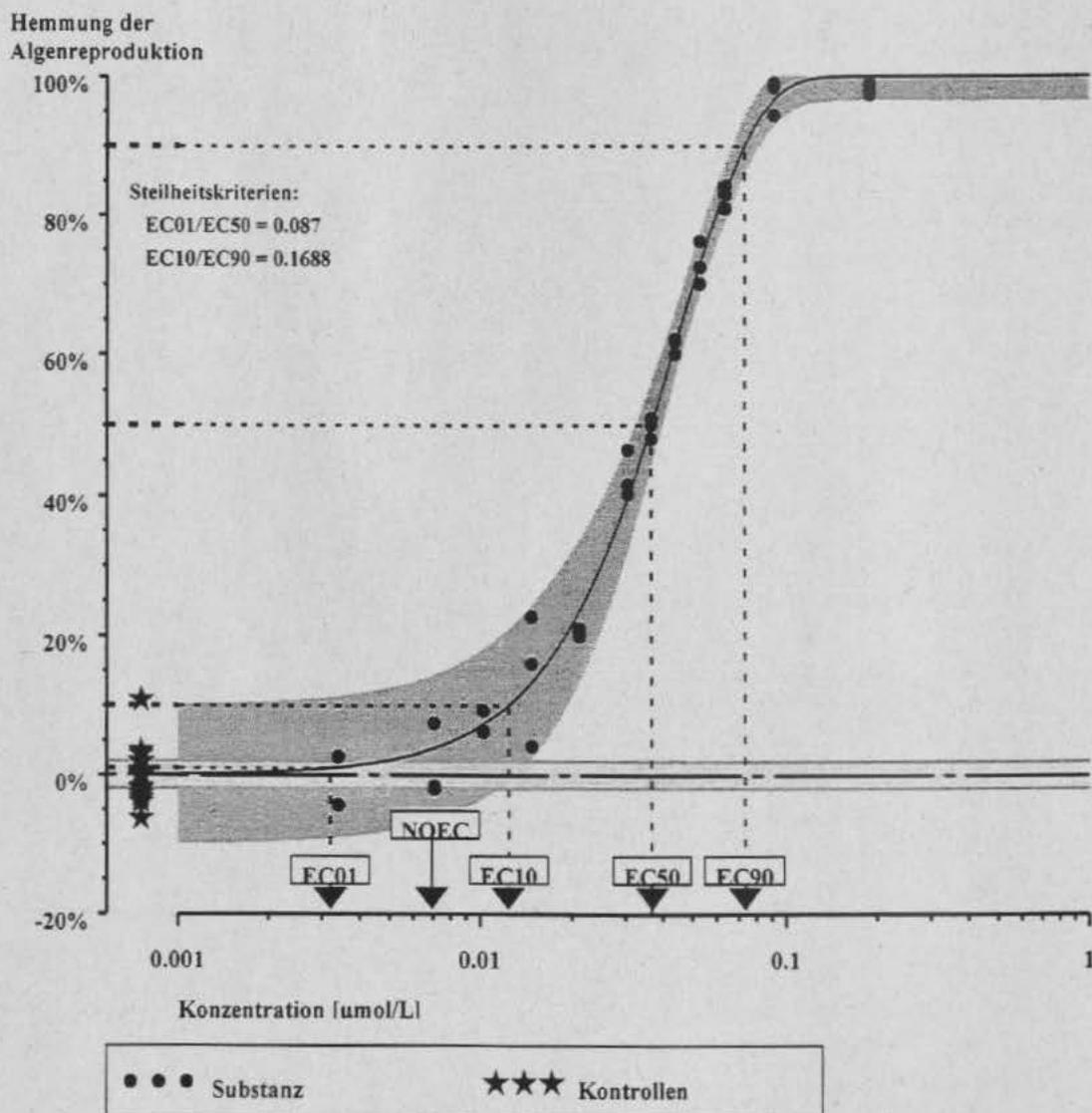
EC90 = 0.20303 (0.18869;0.21636) EC90 = 0.04887 (0.04542;0.05208)

NOEC = 0.0208 µmol/L. LOEC = 0.0405 µmol/L NOEC = 0.00501 mg/L. LOEC = 0.00975 mg/L

Desmetryn

35 Wirkdaten und 17 Kontrollen

Weibull: Wirkung=1-exp(-exp(5.359+3.992*log10(Konzentration)))



EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.00320 [0.00257;0.00385] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00068 [0.00055;0.00082]

EC10 = 0.01242 [0.01111;0.01364]

EC10 = 0.00265 [0.00237;0.00291]

EC50 = 0.03680 [0.03570;0.03787]

EC50 = 0.00785 [0.00761;0.00808]

EC90 = 0.07355 [0.07102;0.07643]

EC90 = 0.01569 [0.01515;0.01630]

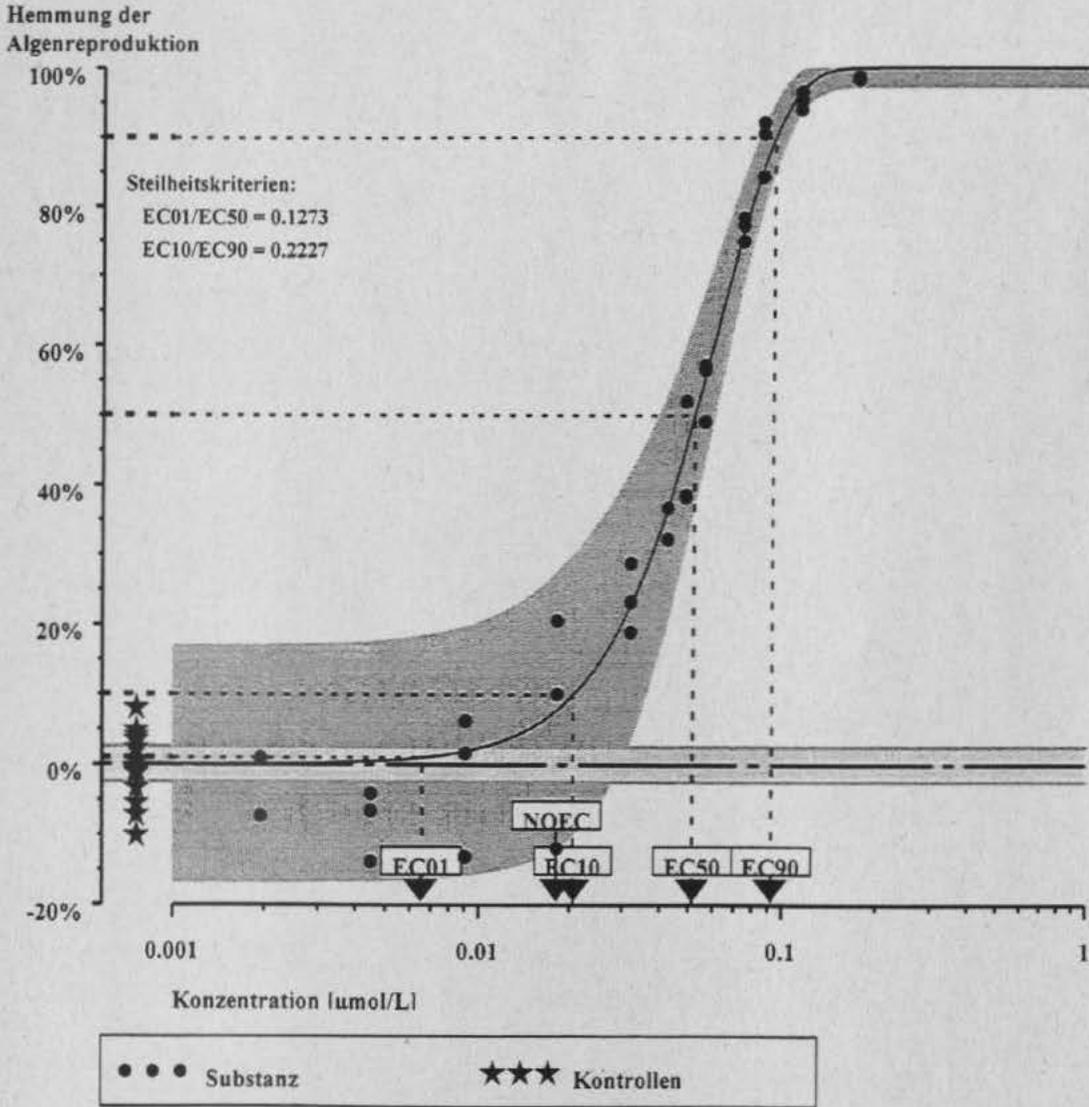
NOEC = 0.0071 umol/L. LOEC = 0.0103 umol/L

NOEC = 0.00151 mg/L. LOEC = 0.00220 mg/L

Dimethametryn

36 Wirkdaten und 16 Kontrollen

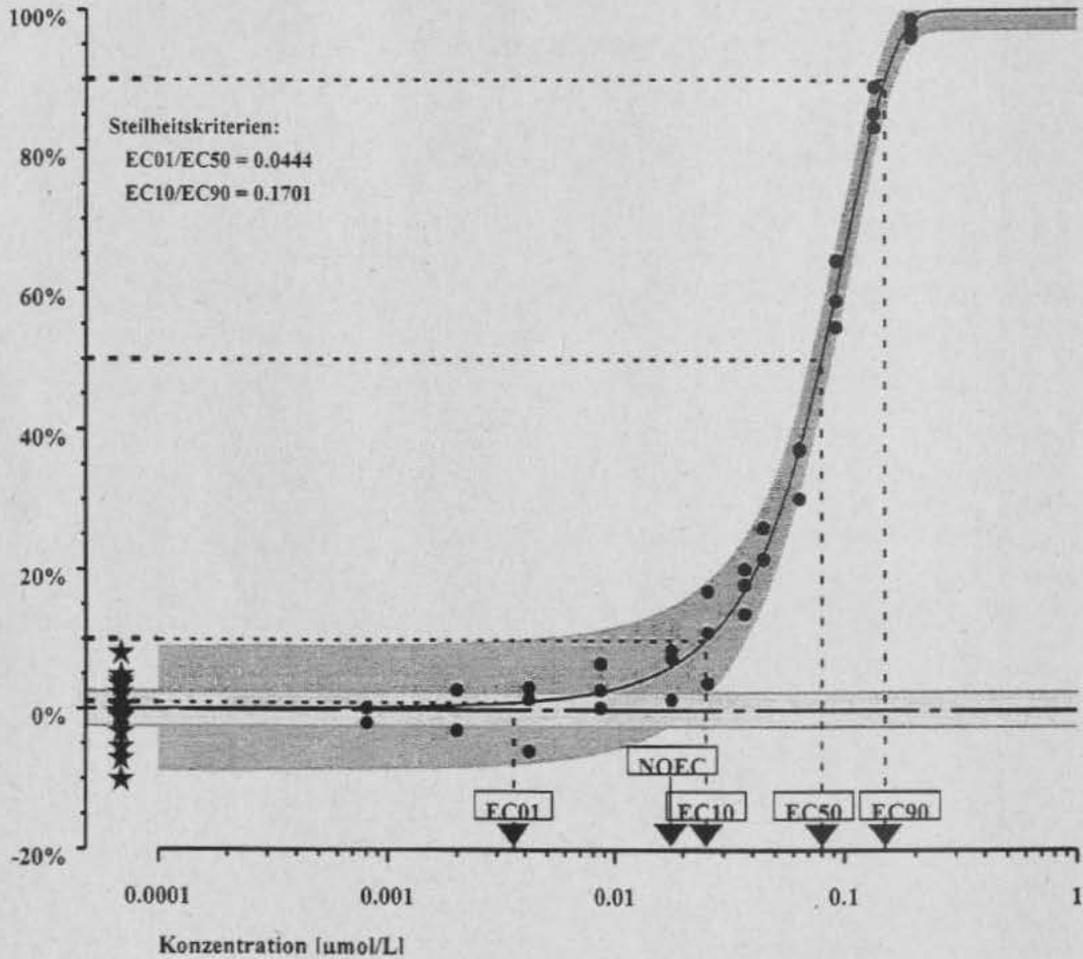
Weibull: Wirkung=1-exp(-exp(5.724+4.729*log10(Konzentration)))



EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 0.00656 [0.00491:0.00861] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00167 [0.00125:0.00220]
 EC10 = 0.02059 [0.01756:0.02381] EC10 = 0.00526 [0.00448:0.00608]
 EC50 = 0.05152 [0.04887:0.05416] EC50 = 0.01316 [0.01248:0.01383]
 EC90 = 0.09245 [0.08821:0.09633] EC90 = 0.02361 [0.02253:0.02460]
 NOEC = 0.0182 µmol/L. LOEC = 0.0318 µmol/L NOEC = 0.00465 mg/L. LOEC = 0.00812 mg/L

Dipropetryn

34 Wirkdaten und 16 Kontrollen

Box-Cox-Weibull: Wirkung= $1-\exp(-\exp(5.640+3.032*\frac{(\text{Konzentration}^{*0.2005}-1)}{0.2005}))$ Hemmung der
Algenreproduktion

● ● ● Substanz

★ ★ ★ Kontrollen

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.00356 [0.00006:0.00816] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00091 [0.00002:0.00208]

EC10 = 0.02526 [0.02101:0.02919]

EC10 = 0.00645 [0.00537:0.00745]

EC50 = 0.08012 [0.07696:0.08327]

EC50 = 0.02046 [0.01965:0.02127]

EC90 = 0.14849 [0.14159:0.15541]

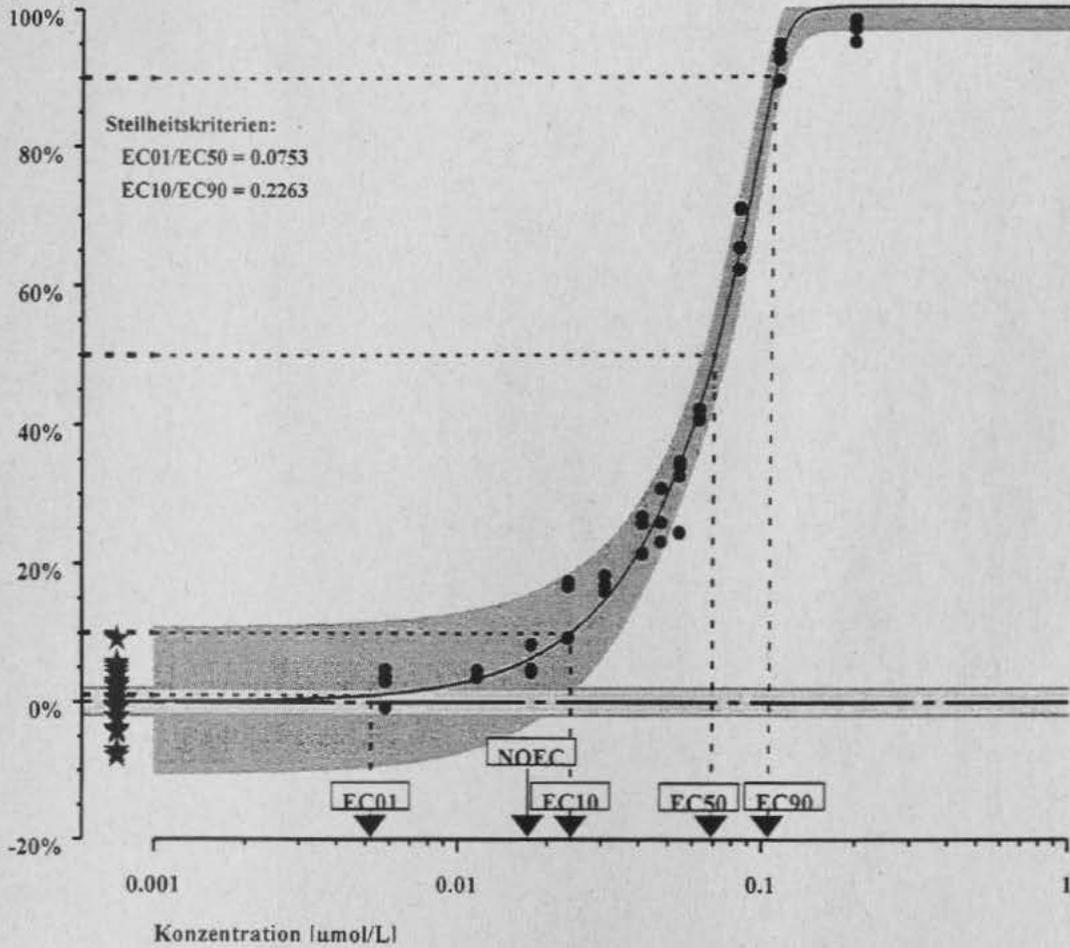
EC90 = 0.03792 [0.03616:0.03969]

NOEC = 0.018 umol/L. LOEC = 0.0259 umol/L

NOEC = 0.00460 mg/L. LOEC = 0.00661 mg/L

Methoprotryn

41 Wirkdaten und 22 Kontrollen

G.Logit: Wirkung= $1/(1+\exp(-(31.194+32.436*(\log_{10}(\text{Konzentration}))))))^{**}0.1074$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte (µmol/L): EC01 = 0.00520 (0.00407;0.00688) EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.00141 (0.00111;0.00187)

EC10 = 0.02384 (0.02151;0.02643)

EC10 = 0.00647 (0.00584;0.00717)

EC50 = 0.06908 (0.06721;0.07103)

EC50 = 0.01875 (0.01824;0.01928)

EC90 = 0.10533 (0.10168;0.10853)

EC90 = 0.02858 (0.02760;0.02945)

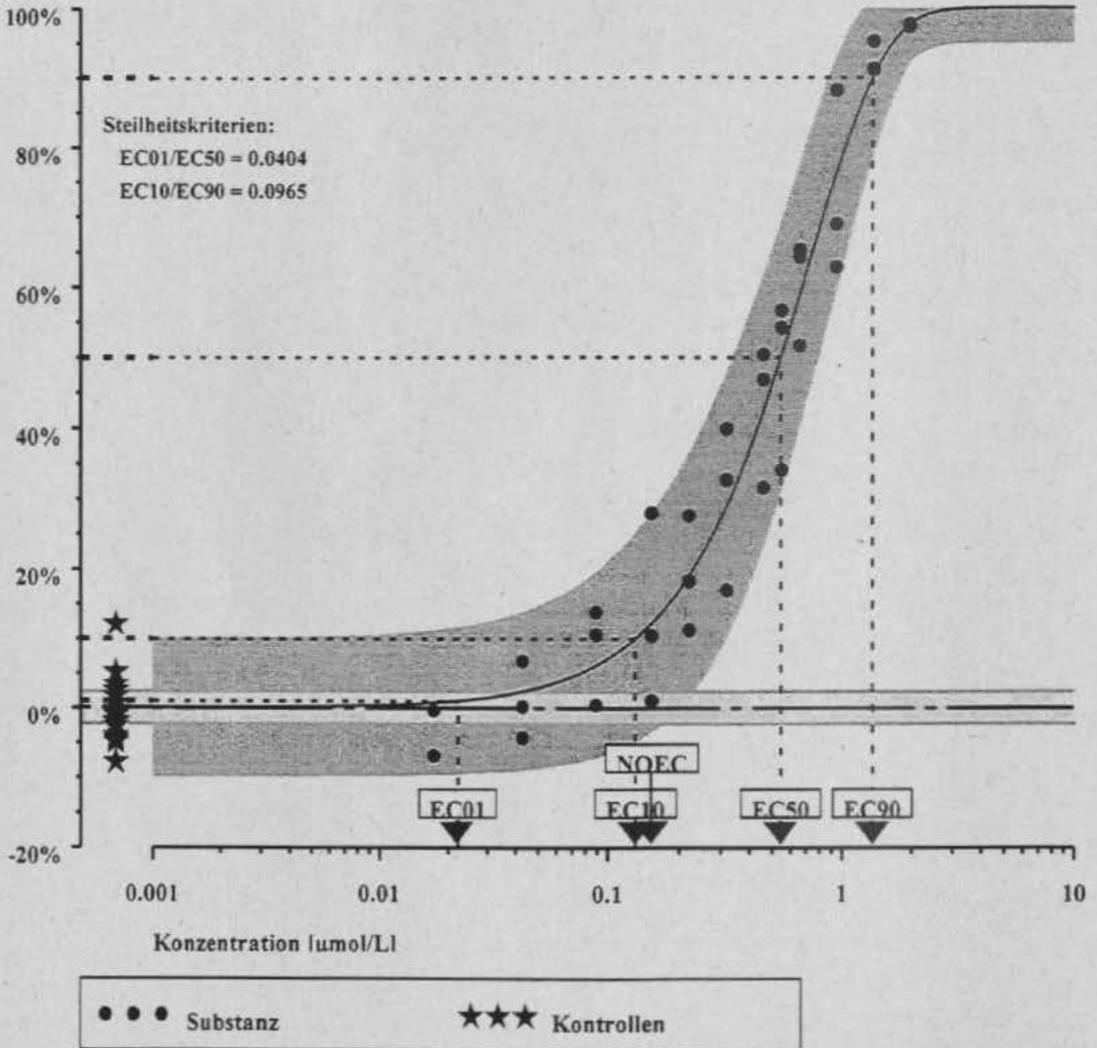
NOEC = 0.0177 µmol/L. LOEC = 0.0234 µmol/L

NOEC = 0.00480 mg/L. LOEC = 0.00635 mg/L

Prometon

35 Wirkdaten und 17 Kontrollen

Weibull: Wirkung=1-exp(-exp(0.430+3.038*log10(Konzentration)))

Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte (umol/L): EC01 = 0.02208 [0.01322;0.03461] EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.00498 [0.00298;0.00780]

EC10 = 0.13111 [0.10145;0.16661]

EC10 = 0.02954 [0.02286;0.03754]

EC50 = 0.54675 [0.49334;0.59967]

EC50 = 0.12318 [0.11114;0.13510]

EC90 = 1.35834 [1.17314;1.53841]

EC90 = 0.30602 [0.26430;0.34659]

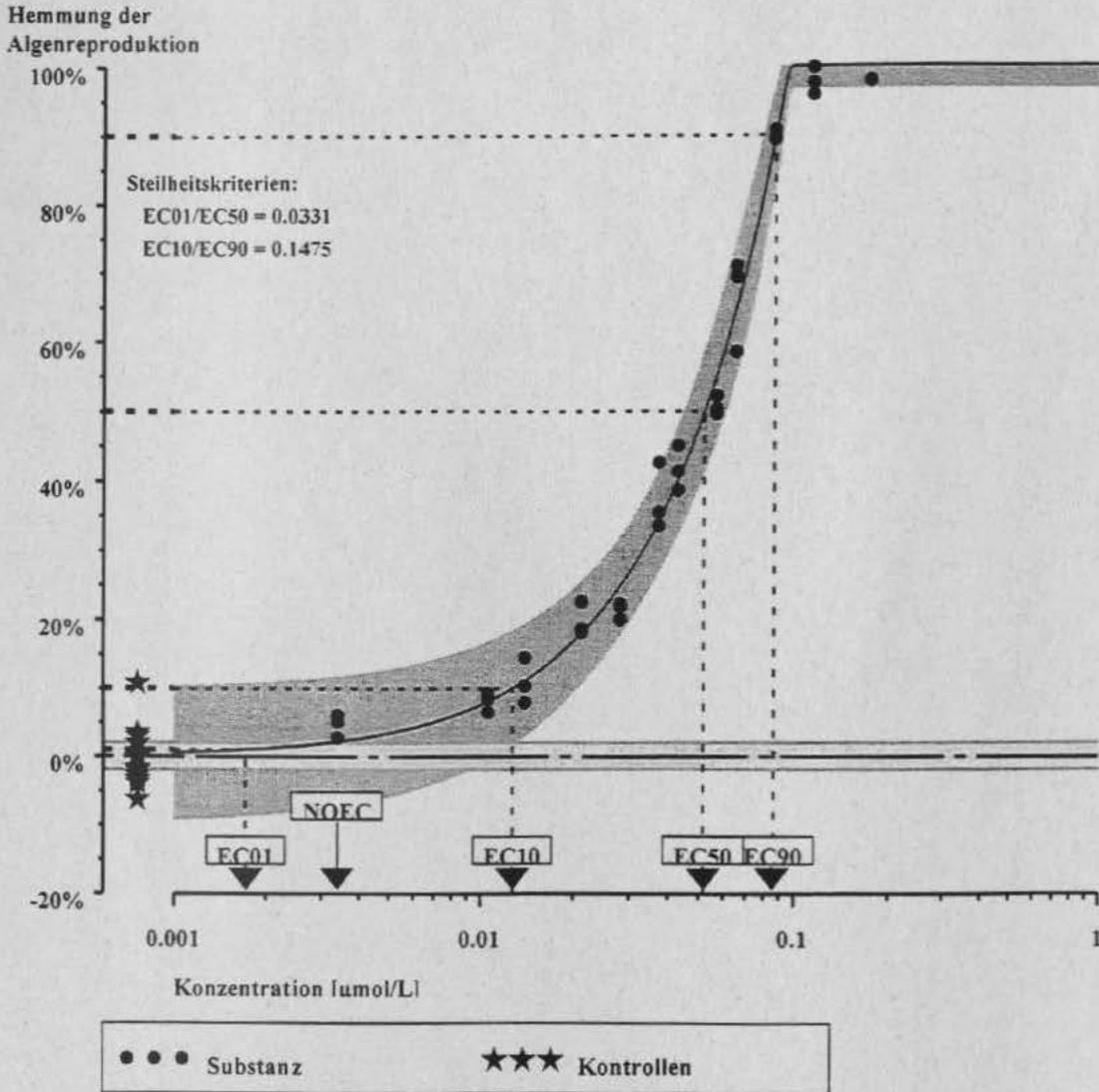
NOEC = 0.1542 umol/L. LOEC = 0.2221 umol/L

NOEC = 0.03474 mg/L. LOEC = 0.05004 mg/L

Prometryn

34 Wirkdaten und 17 Kontrollen

G.Logit: Wirkung=1/(1+exp(-(256.975+251.11*(log10(Konzentration))))))**0.0105



EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 0.00172 [0.00120:0.00226] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00041 [0.00029:0.00055]

EC10 = 0.01275 [0.01094:0.01433]

EC10 = 0.00308 [0.00264:0.00346]

EC50 = 0.05181 [0.05001:0.05388]

EC50 = 0.01251 [0.01207:0.01300]

EC90 = 0.08645 [0.08275:0.08958]

EC90 = 0.02087 [0.01997:0.02162]

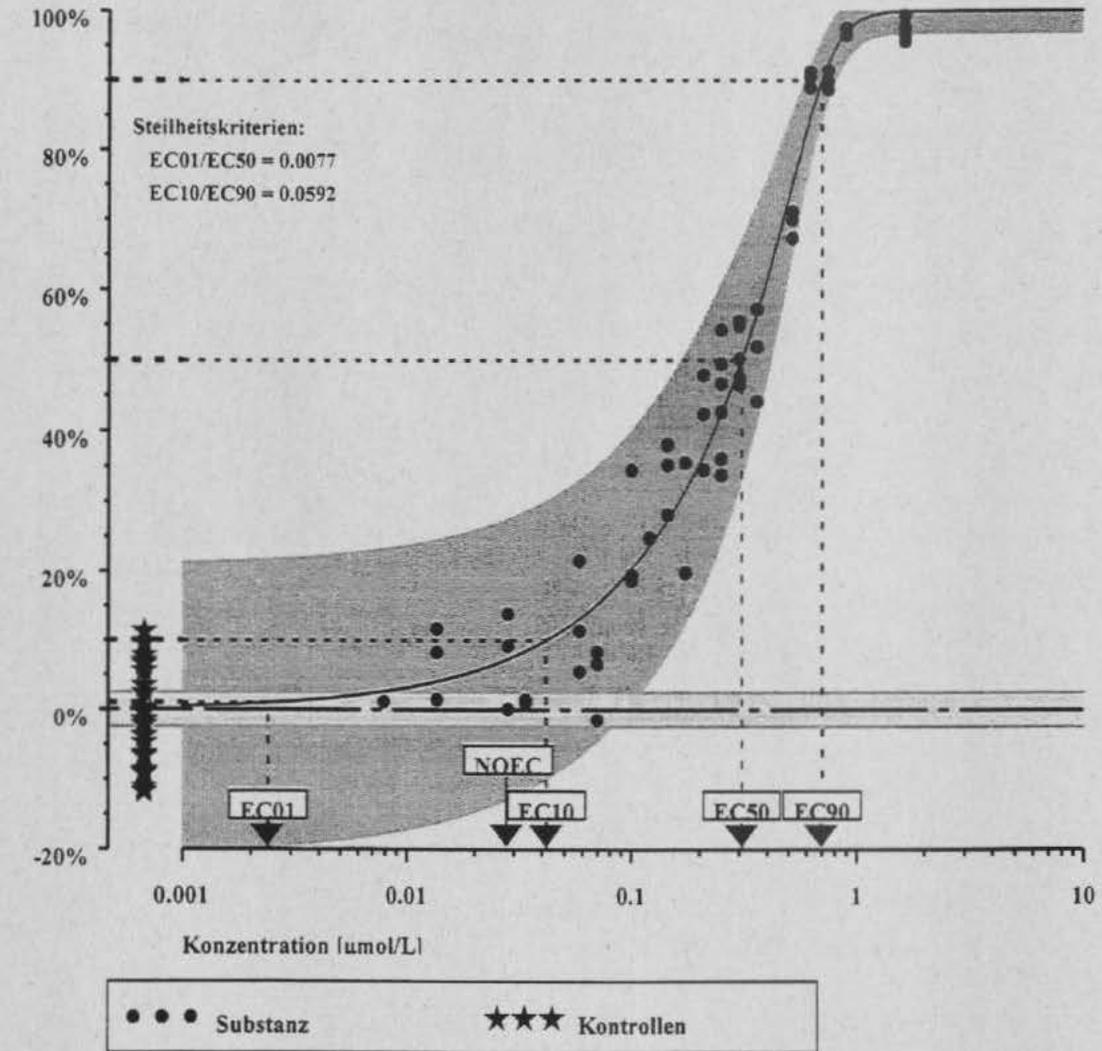
NOEC = 0.0034 µmol/L. LOEC = 0.0140 µmol/L

NOEC = 0.00082 mg/L. LOEC = 0.00338 mg/L

Propazin

60 Wirkdaten und 31 Kontrollen

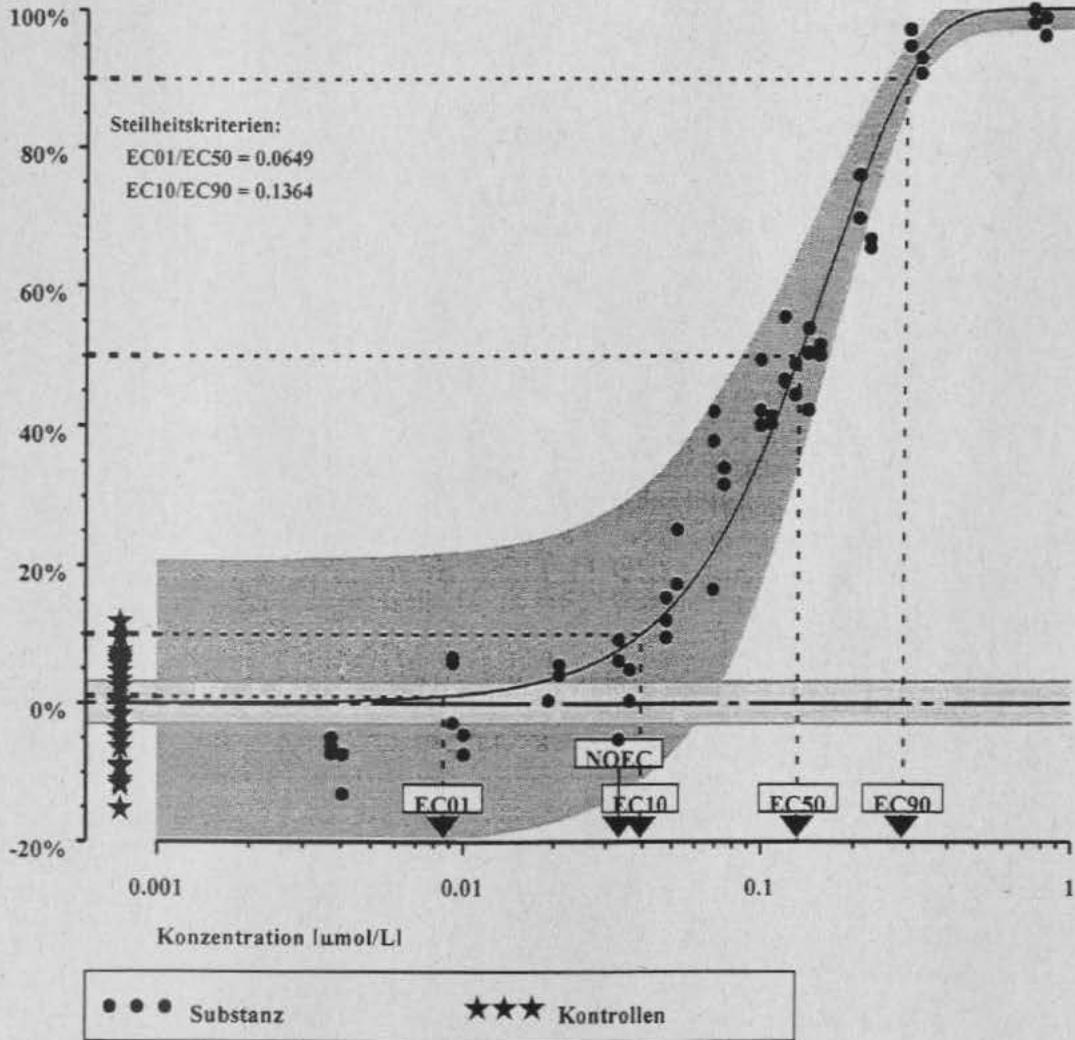
G.Logit: Wirkung=1/(1+exp(-(1.948+14.442*(log10(Konzentration))))))*0.1281

Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte (µmol/L): EC01 = 0.00238 [0.00089;0.10239] EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.00055 [0.00020;0.02352]
 EC10 = 0.04176 [0.02702;0.14767] EC10 = 0.00959 [0.00621;0.03392]
 EC50 = 0.30964 [0.26199;0.33738] EC50 = 0.07113 [0.06018;0.07750]
 EC90 = 0.70515 [0.64818;0.74895] EC90 = 0.16198 [0.14889;0.17204]
 NOEC = 0.0283 µmol/L. LOEC = 0.0586 µmol/L NOEC = 0.00650 mg/L. LOEC = 0.01346 mg/L

Sebuthylazin

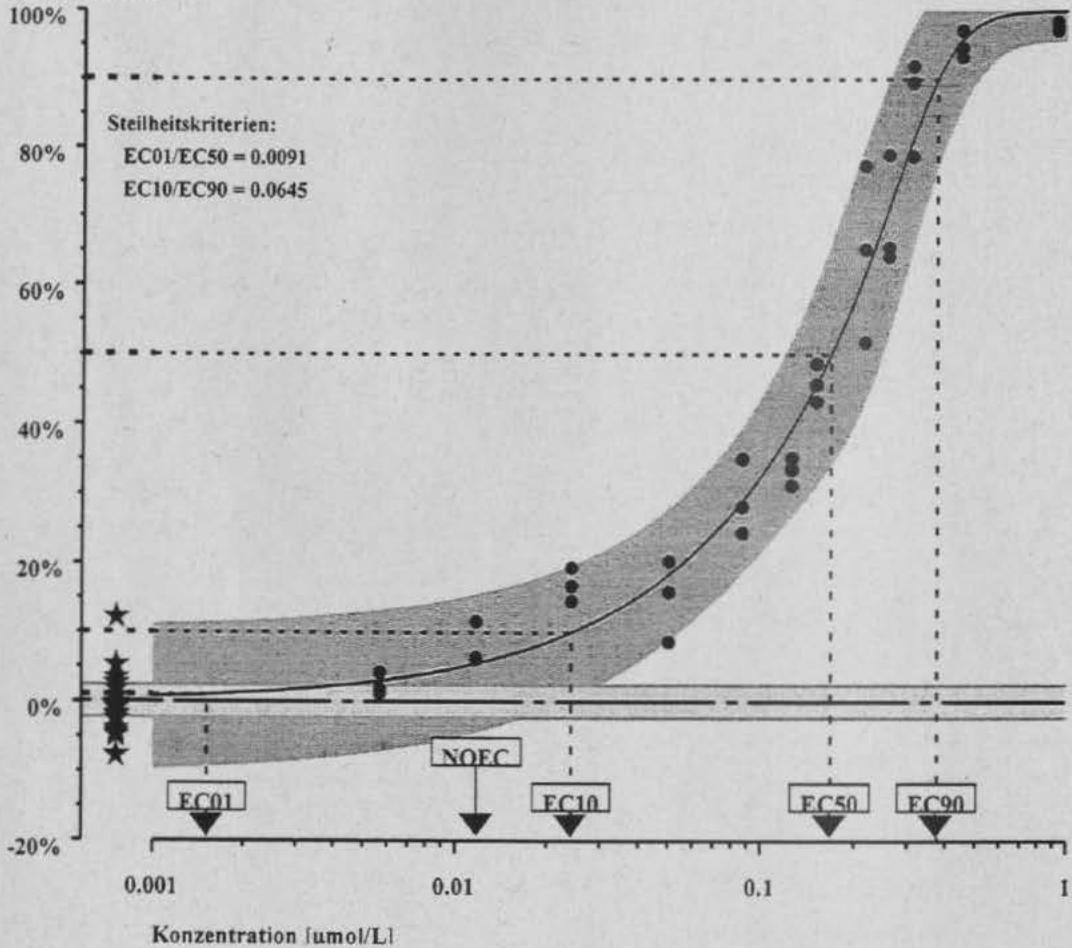
58 Wirkdaten und 26 Kontrollen

Weibull: Wirkung= $1-\exp(-\exp(2.759+3.565 \cdot \log_{10}(\text{Konzentration})))$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.00862 [0.00602;0.01174] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00198 [0.00138;0.00270]
 EC10 = 0.03933 [0.03236;0.04691] EC10 = 0.00903 [0.00743;0.01078]
 EC50 = 0.13278 [0.12431;0.14195] EC50 = 0.03050 [0.02855;0.03261]
 EC90 = 0.28833 [0.27393;0.30265] EC90 = 0.06623 [0.06293;0.06952]
 NOEC = 0.0332 umol/L. LOEC = 0.0478 umol/L NOEC = 0.00763 mg/L. LOEC = 0.01098 mg/L

Sebumeton

35 Wirkdaten und 17 Kontrollen

G.Logit: Wirkung= $1/(1+\exp(-(-5.851+14.151*(\log_{10}(\text{Konzentration}))))))^{**}0.1354$ Hemmung der
Algenreproduktion

● ● ● Substanz

★ ★ ★ Kontrollen

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.00152 | 0.00065:0.00302 | EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00034 | 0.00015:0.000681

EC10 = 0.02425 | 0.01704:0.031761

EC10 = 0.00546 | 0.00384:0.007151

EC50 = 0.16794 | 0.15212:0.183441

EC50 = 0.03784 | 0.03427:0.041331

EC90 = 0.37582 | 0.32424:0.427531

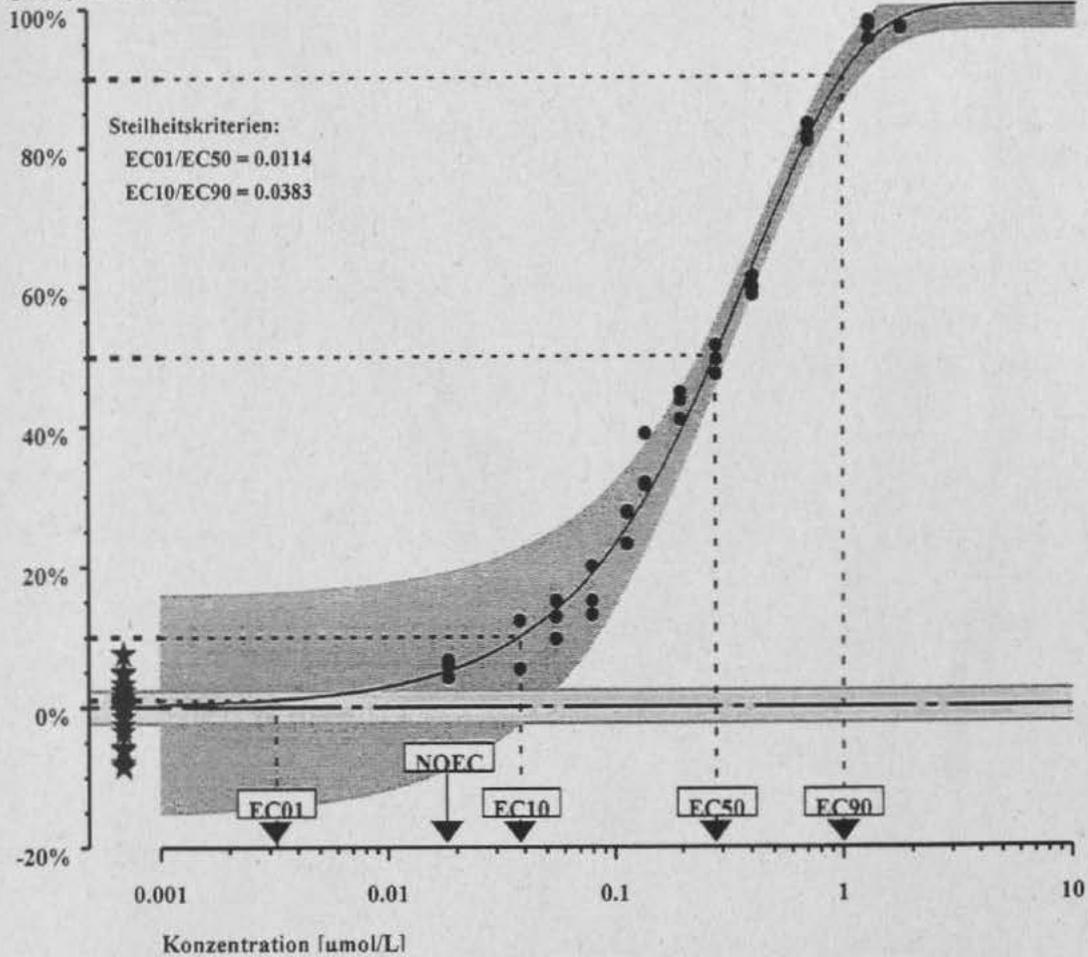
EC90 = 0.08467 | 0.07305:0.096321

NOEC = 0.0118 umol/L. LOEC = 0.0506 umol/L

NOEC = 0.00266 mg/L. LOEC = 0.01140 mg/L

Simazin

35 Wirkdaten und 18 Kontrollen

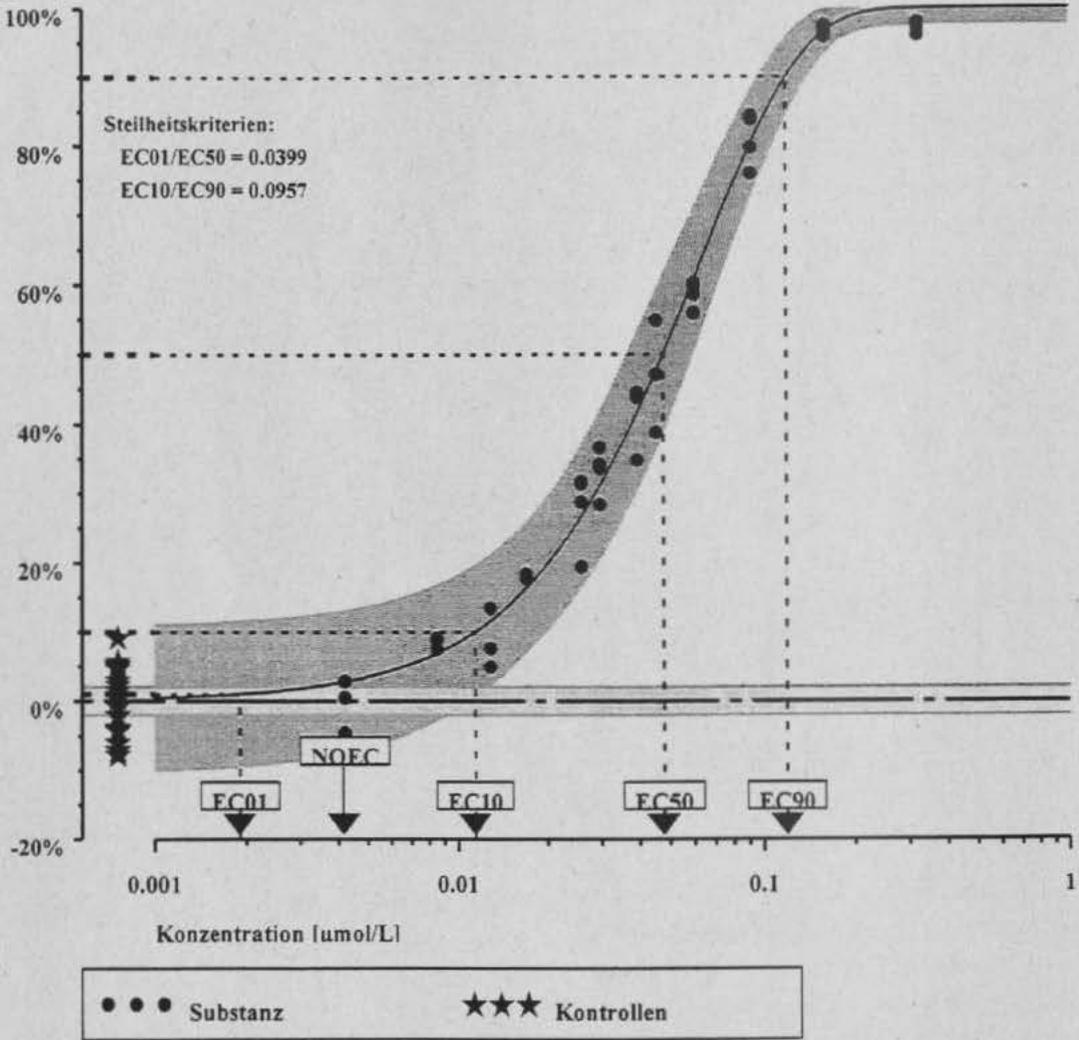
Weibull: Wirkung = $1 - \exp(-\exp(0.831 + 2.178 \cdot \log_{10}(\text{Konzentration})))$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.00321 [0.00239;0.00430] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00065 [0.00048;0.00087]
 EC10 = 0.03848 [0.03324;0.04445] EC10 = 0.00776 [0.00670;0.00896]
 EC50 = 0.28204 [0.27107;0.29435] EC50 = 0.05688 [0.05466;0.05936]
 EC90 = 1.00363 [0.94424;1.07258] EC90 = 0.20239 [0.19042;0.21630]

NOEC = 0.0185 umol/L, LOEC = 0.0551 umol/L NOEC = 0.00373 mg/L, LOEC = 0.01111 mg/L

Simetrvin

44 Wirkdaten und 22 Kontrollen

Weibull: Wirkung = $1 - \exp(-\exp(3.629 + 3.026 \cdot \log_{10}(\text{Konzentration})))$ Hemmung der
Algenreproduktion

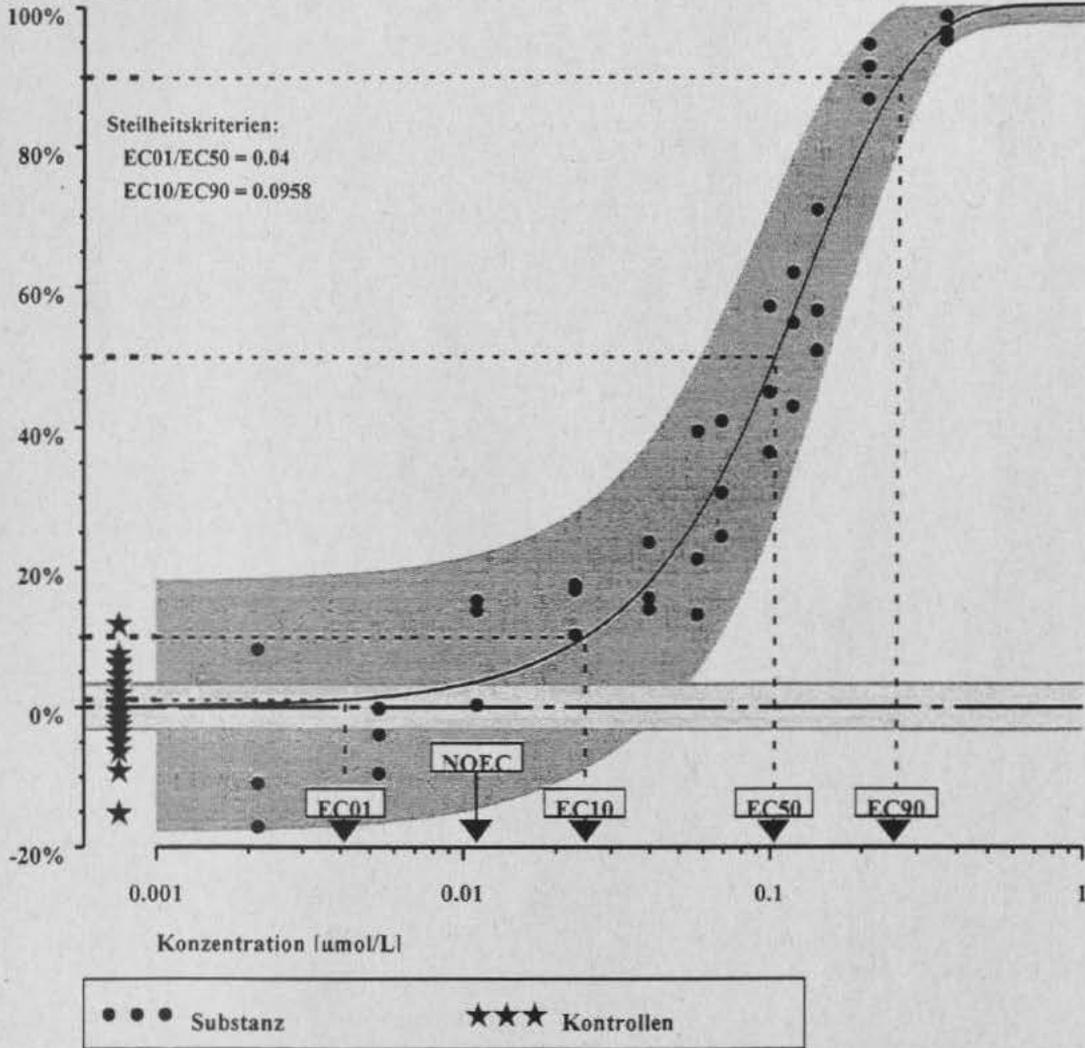
EC-Werte (umol/L): EC01 = 0.00191 (0.00148:0.00245) EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.00041 (0.00032:0.00052)
 EC10 = 0.01141 (0.01007:0.01295) EC10 = 0.00243 (0.00215:0.00276)
 EC50 = 0.04782 (0.04555:0.05016) EC50 = 0.01020 (0.00971:0.01070)
 EC90 = 0.11923 (0.11107:0.12723) EC90 = 0.02543 (0.02369:0.02714)

NOEC = 0.0042 umol/L. LOEC = 0.0085 umol/L NOEC = 0.00090 mg/L. LOEC = 0.00181 mg/L

Terbumeton

36 Wirkdaten und 18 Kontrollen

Weibull: Wirkung=1-exp(-exp(2.617+3.029*log10(Konzentration)))

Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.00414 [0.00236;0.00692] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00093 [0.00053;0.00156]

EC10 = 0.02470 [0.01817;0.03232]

EC10 = 0.00557 [0.00409;0.00728]

EC50 = 0.10346 [0.09191;0.11531]

EC50 = 0.02331 [0.02071;0.02598]

EC90 = 0.25775 [0.22248;0.28923]

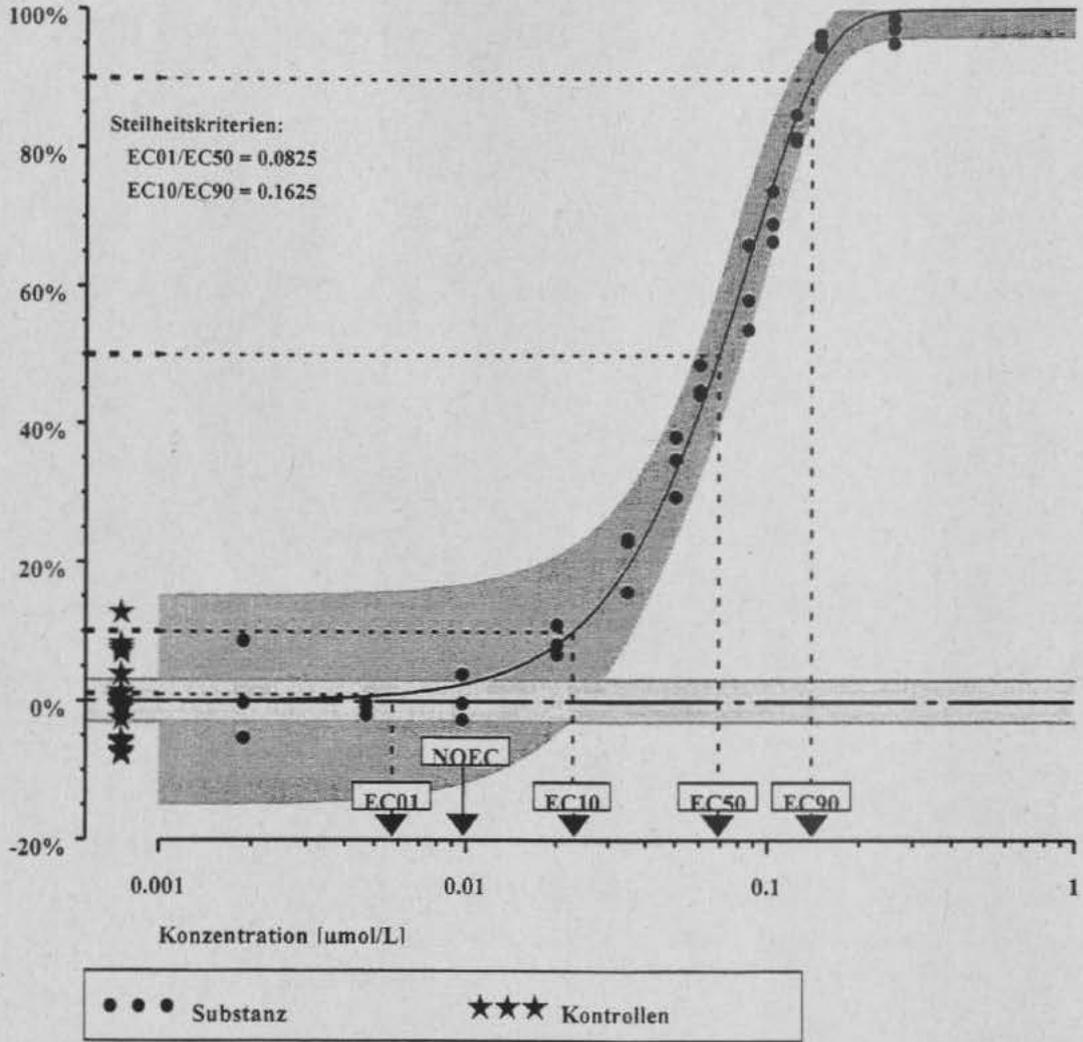
EC90 = 0.05807 [0.05012;0.06516]

NOEC = 0.0111 umol/L. LOEC = 0.0230 umol/L

NOEC = 0.00250 mg/L. LOEC = 0.00518 mg/L

Terbuthylazin

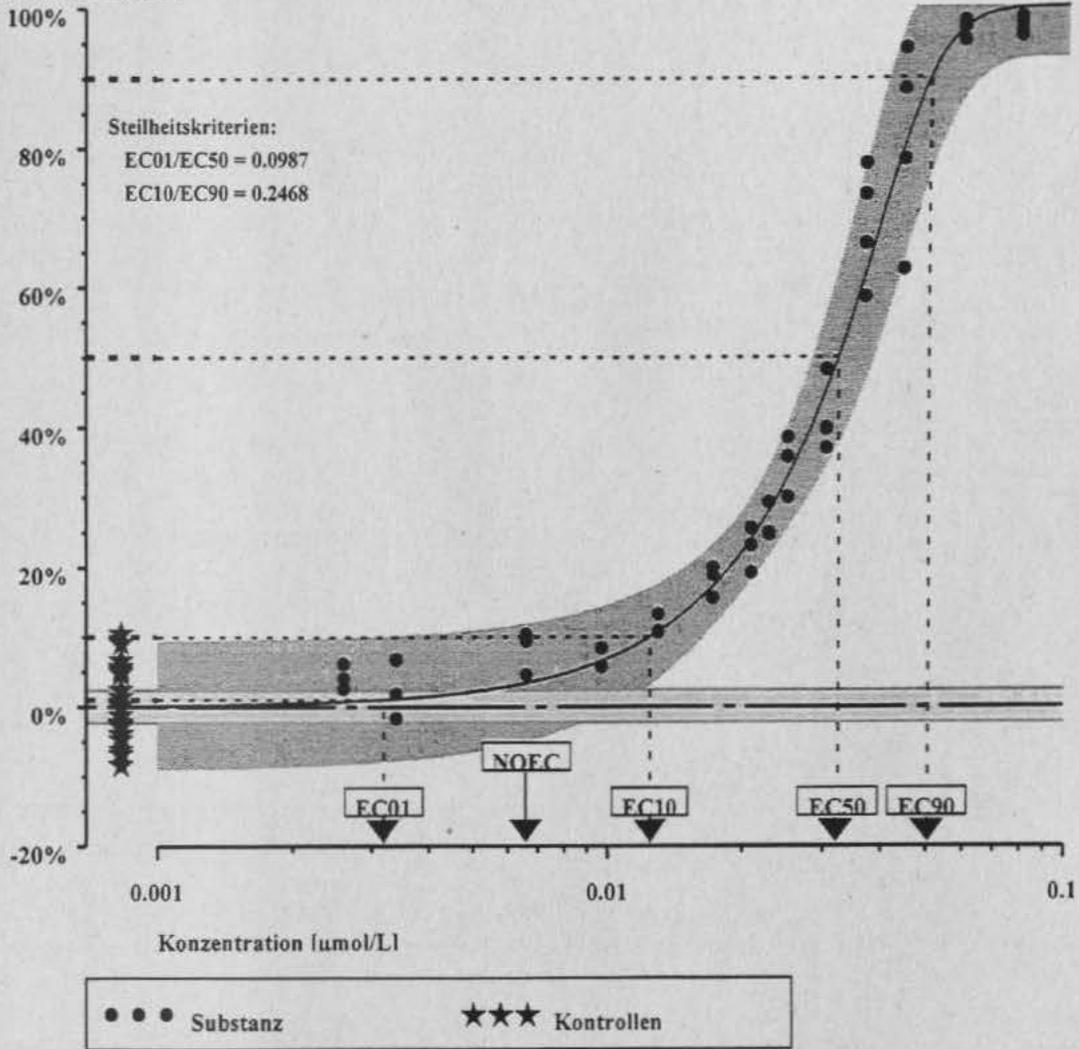
36 Wirkdaten und 18 Kontrollen

Weibull: Wirkung = $1 - \exp(-\exp(4.165 + 3.908 \cdot \log_{10}(\text{Konzentration})))$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 0.00572 [0.00438;0.00735]	EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00131 [0.00101;0.00169]
EC10 = 0.02283 [0.01981;0.02586]	EC10 = 0.00524 [0.00455;0.00594]
EC50 = 0.06926 [0.06575;0.07250]	EC50 = 0.01591 [0.01510;0.01665]
EC90 = 0.14051 [0.13326;0.14775]	EC90 = 0.03228 [0.03061;0.03394]
NOEC = 0.0097 µmol/L. LOEC = 0.0202 µmol/L	NOEC = 0.00464 mg/L. LOEC = 0.00802 mg/L

Terbutryn

46 Wirkdaten und 23 Kontrollen

G.Logit: Wirkung= $1/(1+\exp(-(26.279+20.004*(\log_{10}(\text{Konzentration})))))*0.1948$ Hemmung der
Algenreproduktion

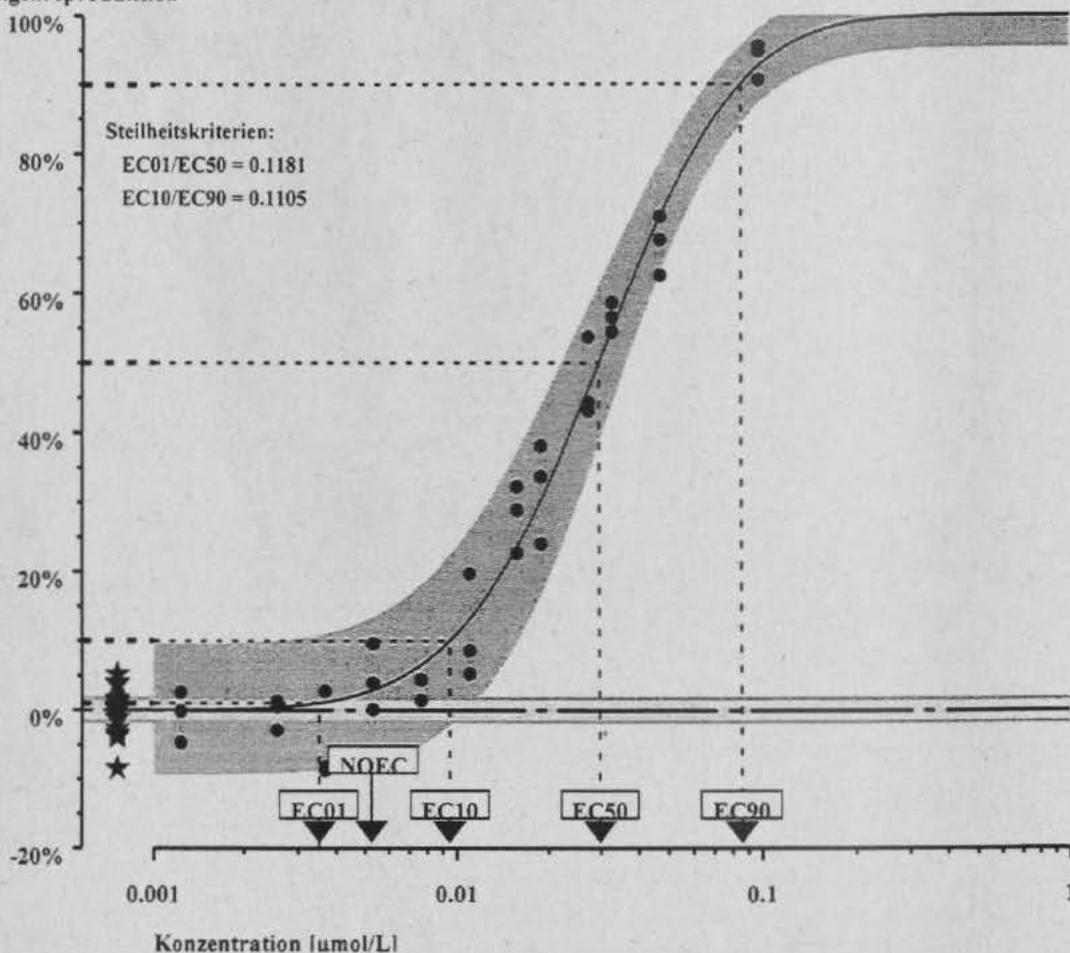
EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 0.00319 (0.00243:0.00444) EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00077 (0.00059:0.00107)
 EC10 = 0.01245 (0.01124:0.01382) EC10 = 0.00301 (0.00271:0.00333)
 EC50 = 0.03235 (0.03096:0.03363) EC50 = 0.00781 (0.00747:0.00812)
 EC90 = 0.05046 (0.04593:0.05478) EC90 = 0.01218 (0.01108:0.01322)

NOEC = 0.0066 µmol/L. LOEC = 0.0130 µmol/L NOEC = 0.00159 mg/L. LOEC = 0.00314 mg/L

D1.2 Algtoxizität der 16 Substanzen *unähnlicher* Wirkung

Aclonifen

35 Wirkdaten und 18 Kontrollen

Box-Cox-Weibull: Wirkung = $1 - \exp(-\exp(2.402 + 0.408 * (((\text{Konzentration}^{**} - 0.3398) - 1) / -0.3398)))$ Hemmung der
Algenreproduktion

● ● ● Substanz

★ ★ ★ Kontrollen

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.00351 (0.00175:0.00571) EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00093 (0.00046:0.00151)

EC10 = 0.00947 (0.00751:0.01161)

EC10 = 0.00251 (0.00199:0.00307)

EC50 = 0.02969 (0.02739:0.03202)

EC50 = 0.00786 (0.00725:0.00847)

EC90 = 0.08566 (0.07376:0.10343)

EC90 = 0.02267 (0.01952:0.02737)

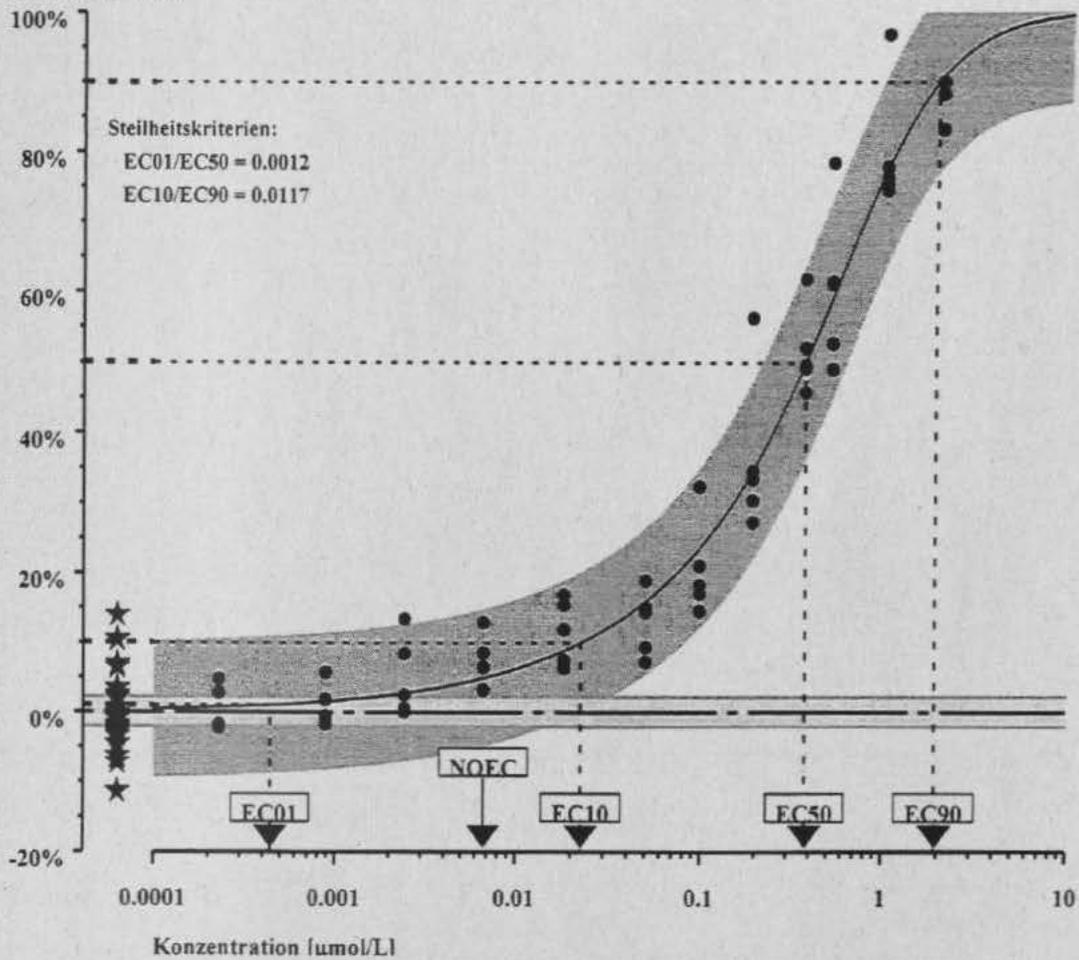
NOEC = 0.0053 umol/L. LOEC = 0.0110 umol/L

NOEC = 0.00140 mg/L. LOEC = 0.00291 mg/L

8-Azaguanin

59 Wirkdaten und 30 Kontrollen

G.Logit: Wirkung=1/(1+exp(-(-0.287+4.240*(log10(Konzentration))))))**0.3174

Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.00044 [0.00017;0.00280] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00007 [0.00003;0.00043]
 EC10 = 0.02274 [0.01620;0.04091] EC10 = 0.00346 [0.00246;0.00622]
 EC50 = 0.38079 [0.31810;0.43488] EC50 = 0.05793 [0.04839;0.06615]
 EC90 = 1.93840 [1.23954;2.95876] EC90 = 0.29487 [0.18856;0.45009]

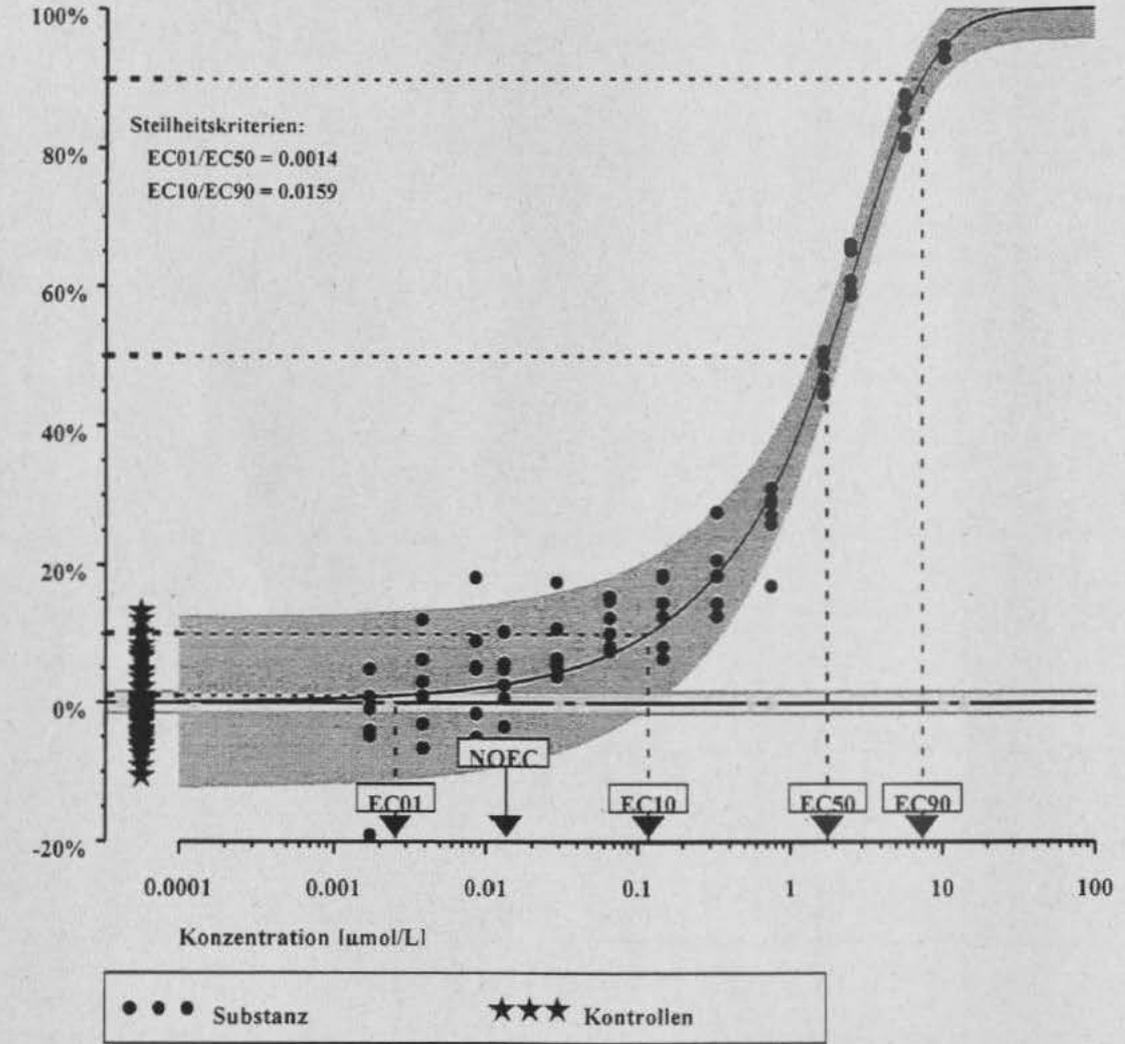
NOEC = 0.0067 umol/L. LOEC = 0.0184 umol/L NOEC = 0.00102 mg/L. LOEC = 0.00280 mg/L

Azaserin

75 Wirkdaten und 54 Kontrollen

$$G.\text{Logit: Wirkung} = 1 / (1 + \exp(-(-3.875 + 5.254 * (\log_{10}(\text{Konzentration}))))))^{**} 0.2632$$

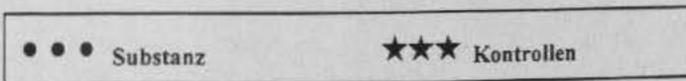
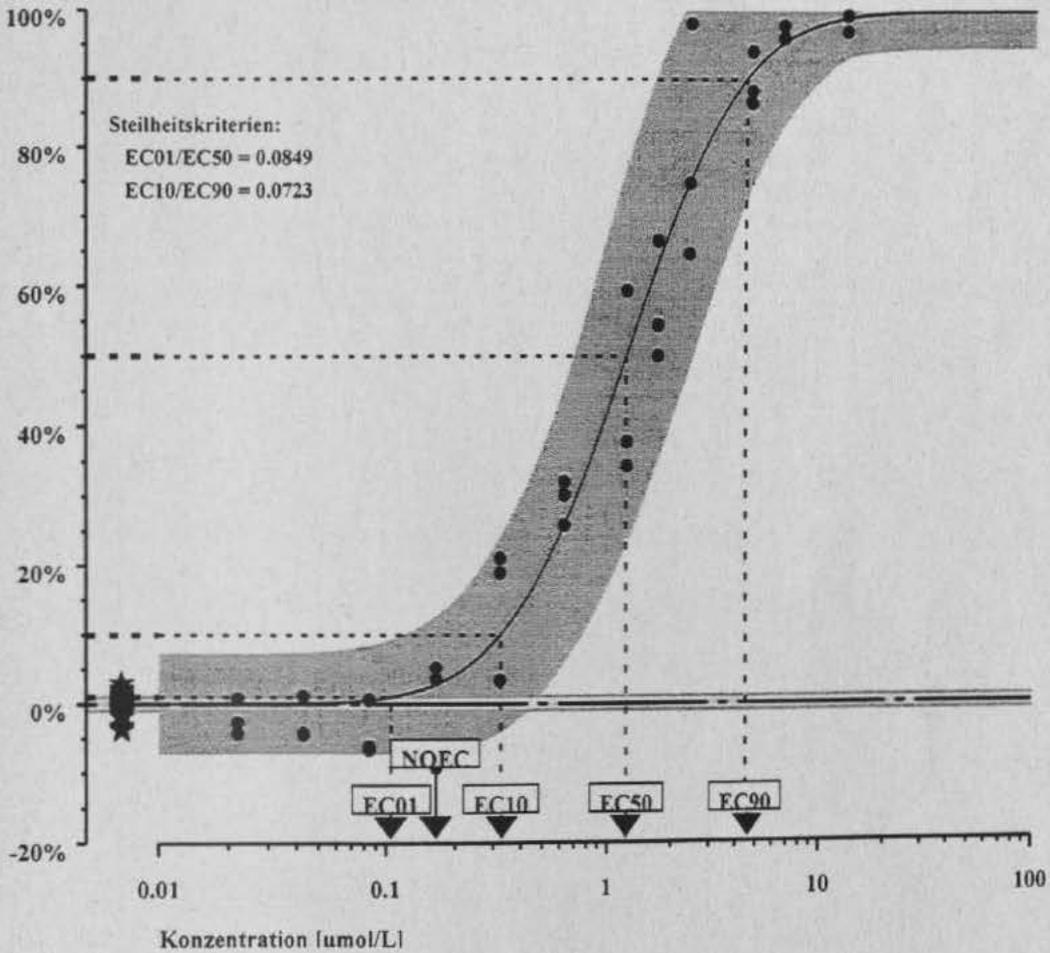
Hemmung der Algenreproduktion



EC-Werte (umol/L): EC01 = 0.00256 [0.00107;0.00669]	EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.00044 [0.00018;0.00116]
EC10 = 0.11818 [0.08497;0.16929]	EC10 = 0.02046 [0.01471;0.02930]
EC50 = 1.78033 [1.66751;1.91313]	EC50 = 0.30818 [0.28865;0.33116]
EC90 = 7.45496 [6.70909;8.58889]	EC90 = 1.29045 [1.16134;1.48674]
NOEC = 0.0131 umol/l, LOEC = 0.0294 umol/L	NOEC = 0.00227 mg/L, LOEC = 0.00509 mg/L

CCCP

36 Wirkdaten und 18 Kontrollen

Box-Cox-Weibull: $\text{Wirkung} = 1 - \exp(-\exp(-0.615 + 1.212 * (((\text{Konzentration}^{**} - 0.3163) - 1) / -0.3163)))$ Hemmung der
Algenreproduktion

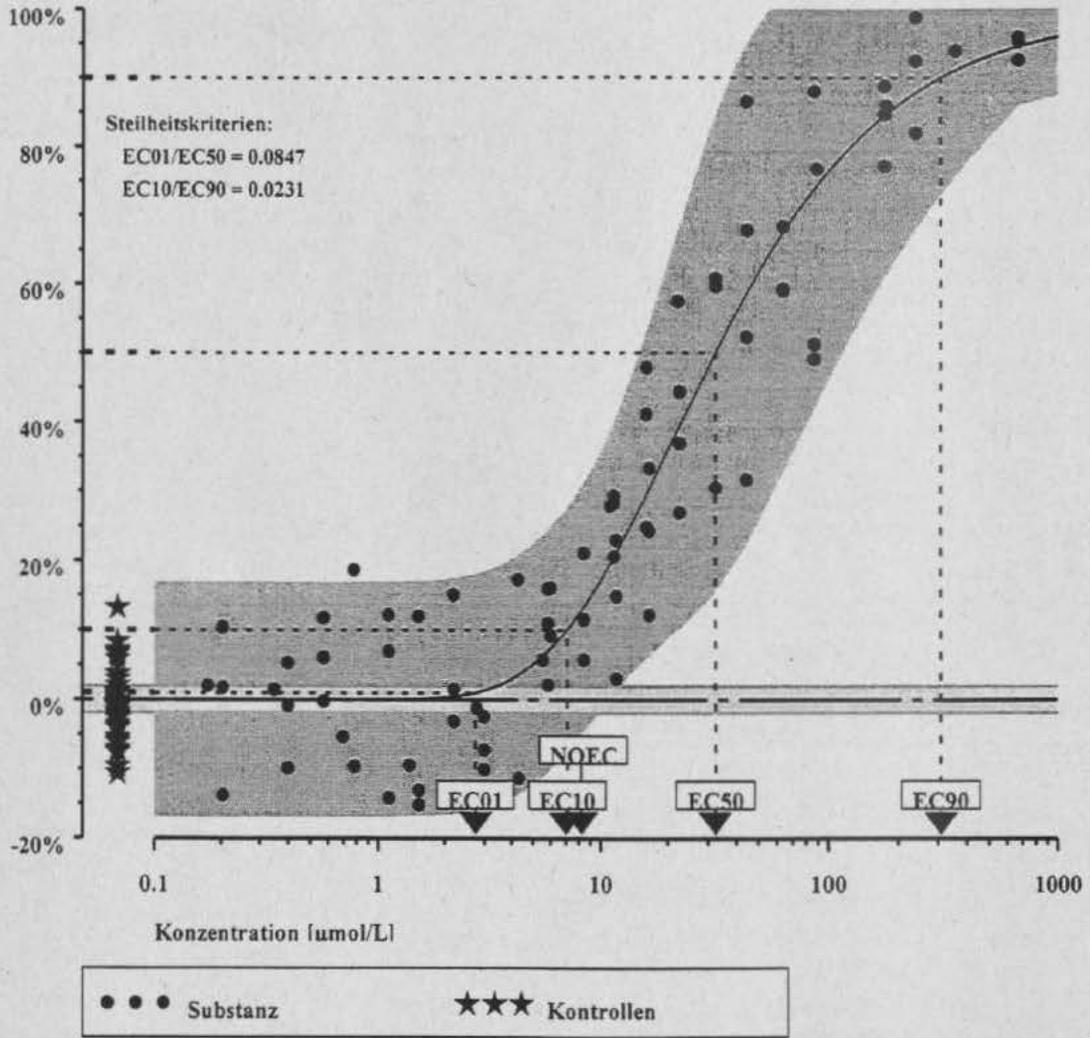
EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.10494 [0.02448:0.24126] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.02147 [0.00501:0.04937]
 EC10 = 0.32506 [0.22387:0.47447] EC10 = 0.06651 [0.04581:0.09709]
 EC50 = 1.23663 [0.97510:1.59453] EC50 = 0.25304 [0.19952:0.32627]
 EC90 = 4.49566 [2.96265:6.63827] EC90 = 0.91990 [0.60622:1.35832]

NOEC = 0.1650 umol/l. LOEC = 0.3235 umol/L NOEC = 0.03376 mg/L. LOEC = 0.06619 mg/L

Chloramphenicol

83 Wirkdaten und 38 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(-3.695+1.503*(((Konzentration**-0.2127)-1)/-0.2127))

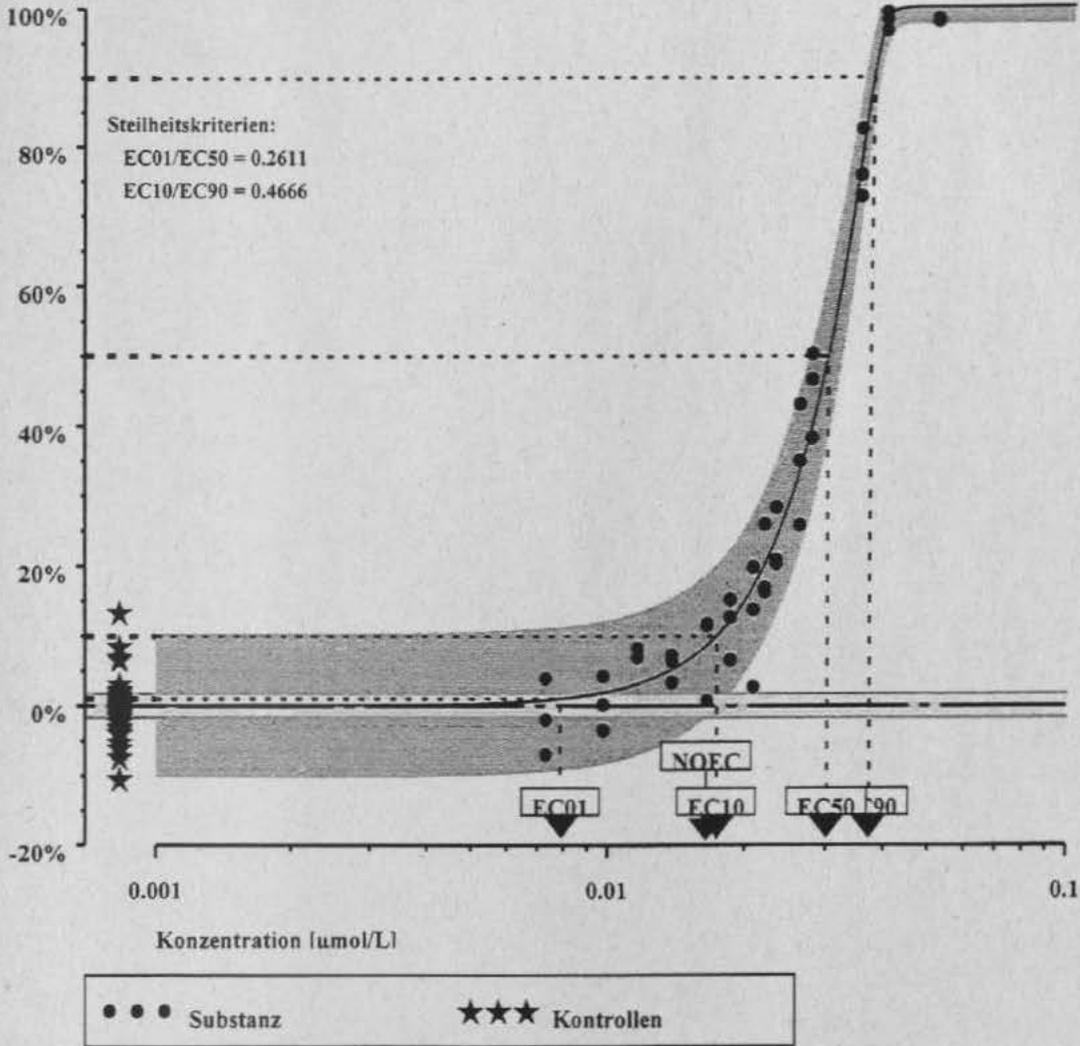
Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte (µmol/L): EC01 = 2.75310 [0.93421;4.72378] EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.88964 [0.30188;1.52644]
 EC10 = 7.13899 [5.18791;9.17766] EC10 = 2.30689 [1.67642;2.96567]
 EC50 = 32.5001 [25.4404;43.4097] EC50 = 10.5021 [8.22081;14.0274]
 EC90 = 308.545 [160.969;749.260] EC90 = 99.7034 [52.0156;242.116]

NOEC = 8.465 µmol/l. LOEC = 11.549 µmol/L NOEC = 2.73538 mg/L. LOEC = 3.73194 mg/L

Dodecyltrimethylammoniumchlorid

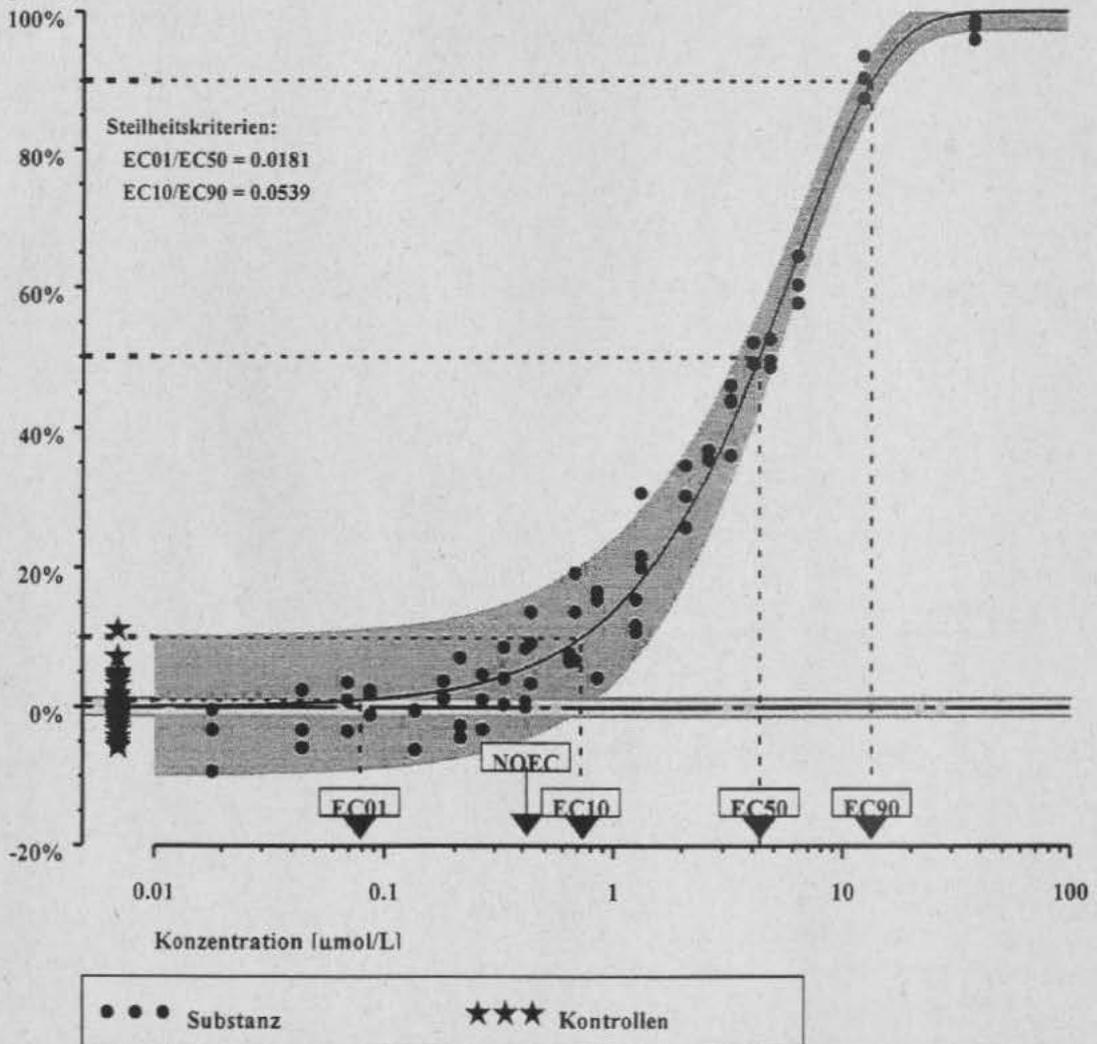
41 Wirkdaten und 36 Kontrollen

G.Logit: Wirkung= $1/(1+\exp(-(-122.336+86.357*(\log_{10}(\text{Konzentration})))))*0.0777$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte (umol/L): EC01 = 0.00788 [0.00664:0.00947] EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.00208 [0.00175:0.00250]
 EC10 = 0.01738 [0.01612:0.01875] EC10 = 0.00459 [0.00425:0.00495]
 EC50 = 0.03020 [0.02948:0.03097] EC50 = 0.00797 [0.00778:0.00817]
 EC90 = 0.03725 [0.03627:0.03808] EC90 = 0.00983 [0.00957:0.01005]
 NOEC = 0.0165 umol/L. LOEC = 0.0186 umol/L NOEC = 0.00435 mg/L. LOEC = 0.00491 mg/L

Fenfuram

72 Wirkdaten und 36 Kontrollen

Weibull: Wirkung = $1 - \exp(-\exp(-1.911 + 2.431 \cdot \log_{10}(\text{Konzentration})))$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.07836 [0.05756:0.10561] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.01577 [0.01158:0.02125]

EC10 = 0.72534 [0.62706:0.83983]

EC10 = 0.14595 [0.12618:0.16899]

EC50 = 4.31895 [4.11203:4.53037]

EC50 = 0.86906 [0.82742:0.91160]

EC90 = 13.4638 [12.3965:14.6677]

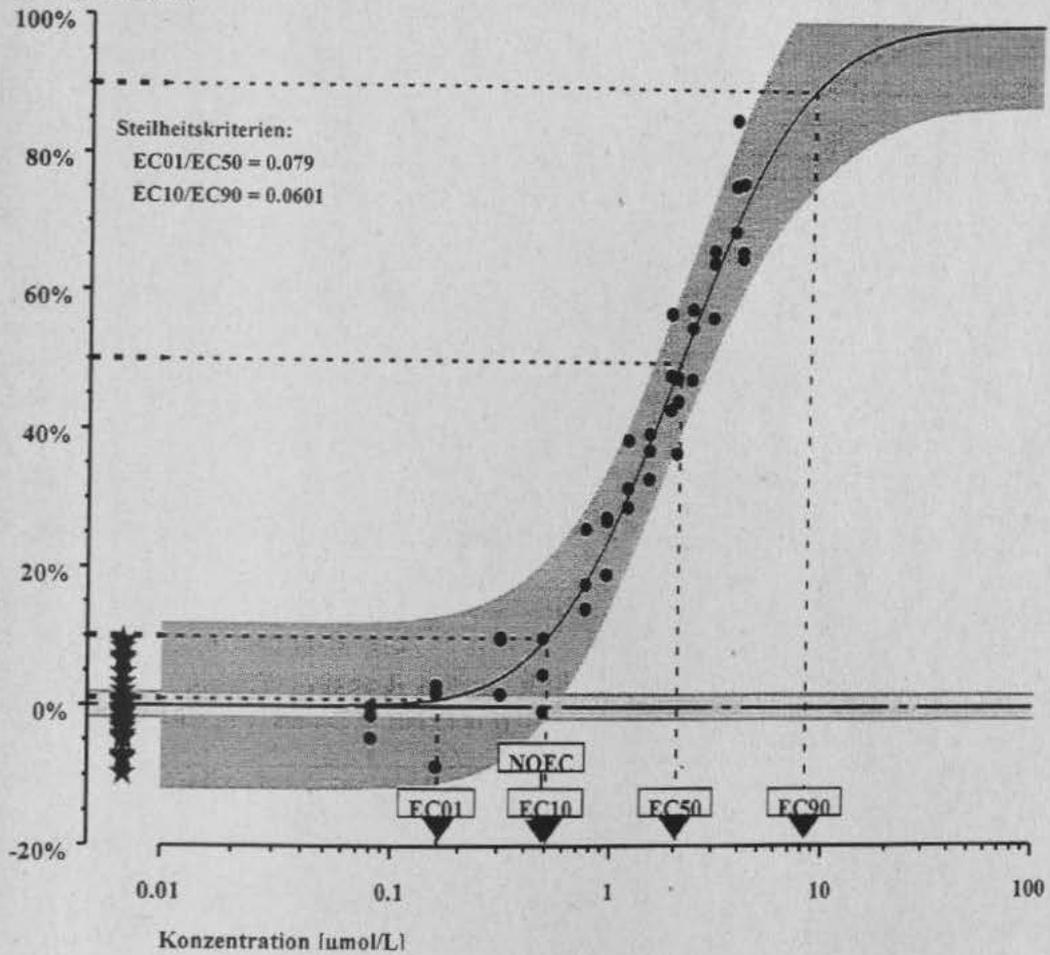
EC90 = 2.70918 [2.49443:2.95143]

NOEC = 0.4133 umol/L. LOEC = 0.4372 umol/L

NOEC = 0.08316 mg/L. LOEC = 0.08797 mg/L

Kresoxim-methyl

42 Wirkdaten und 34 Kontrollen

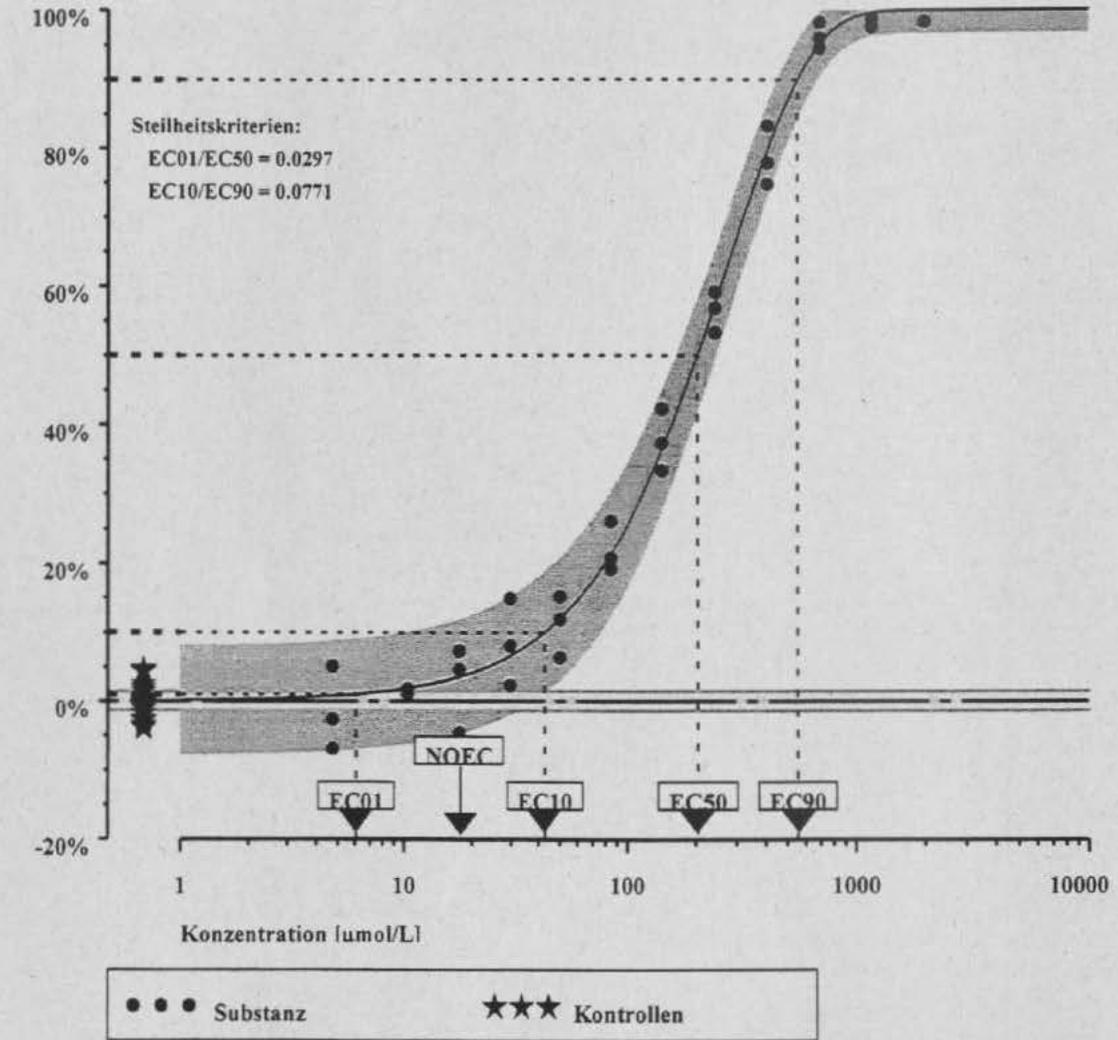
Box-Cox-Weibull: $\text{Wirkung} = 1 - \exp(-\exp(-1.221 + 1.346 * (((\text{Konzentration} ** -0.3322) - 1) / -0.3322)))$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.16110 (0.04962:0.32864) EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.05048 (0.01555:0.10298)
 EC10 = 0.50586 (0.37518:0.63593) EC10 = 0.15851 (0.11756:0.19926)
 EC50 = 2.03980 (1.88812:2.18870) EC50 = 0.63915 (0.59162:0.68581)
 EC90 = 8.41315 (0.00000:43.8772) EC90 = 2.63618 (0.00000:13.7485)

NOEC = 0.4820 umol/L, LOEC = 0.7531 umol/L NOEC = 0.15103 mg/L, LOEC = 0.23598 mg/L

Metalaxyl

36 Wirkdaten und 18 Kontrollen

Weibull: Wirkung = $1 - \exp(-\exp(-6.774 + 2.772 \cdot \log_{10}(\text{Konzentration})))$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 6.08309 [4.19404;8.37501] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 1.69925 [1.17156;2.33948]

EC10 = 42.8385 [35.4841;50.8291]

EC10 = 11.9665 [9.91212;14.1986]

EC50 = 204.860 [190.576;218.316]

EC50 = 57.2255 [53.2354;60.9843]

EC90 = 555.350 [505.375;606.240]

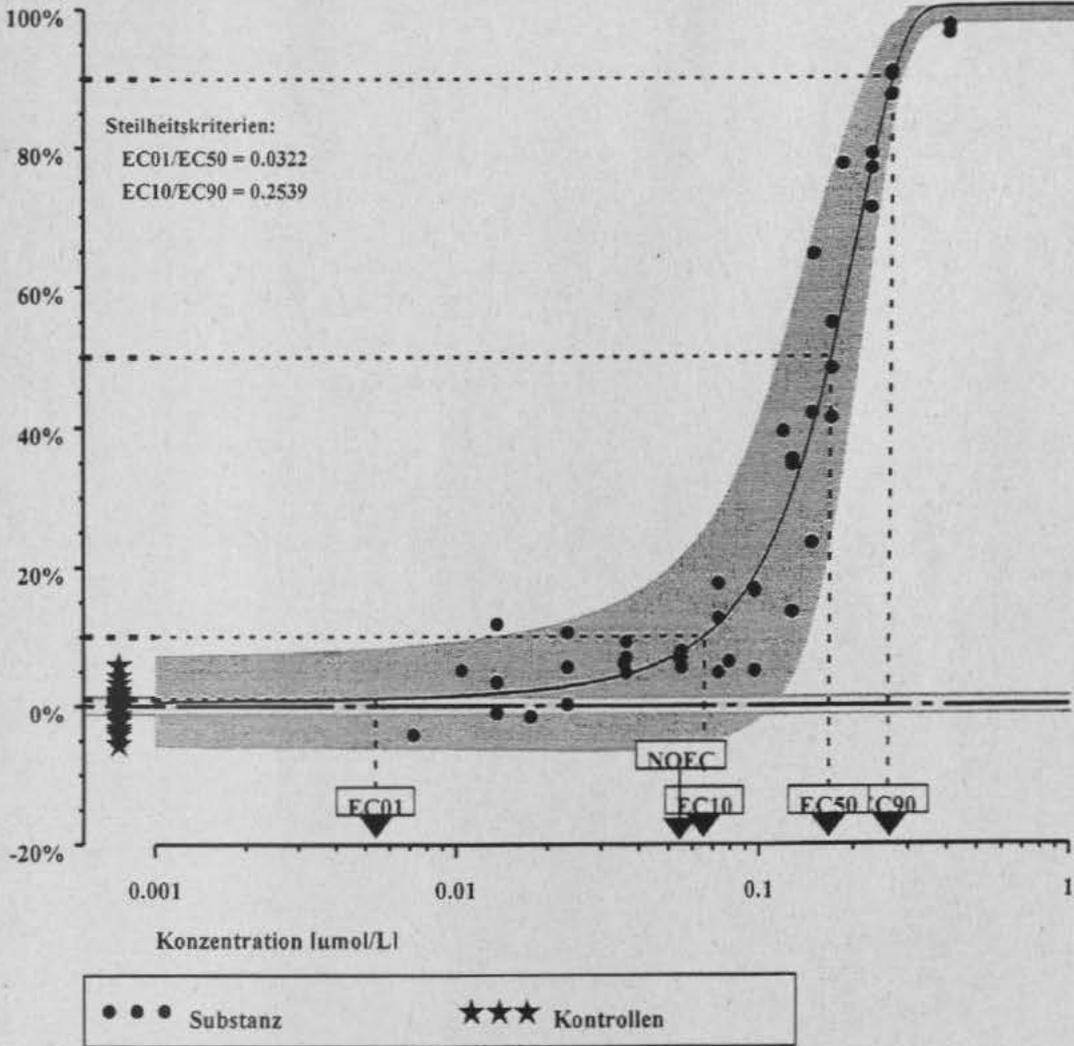
EC90 = 155.131 [141.172;169.347]

NOEC = 17.609 umol/l. LOEC = 29.759 umol/L

NOEC = 4.91890 mg/L. LOEC = 8.31288 mg/L

Metazachlor

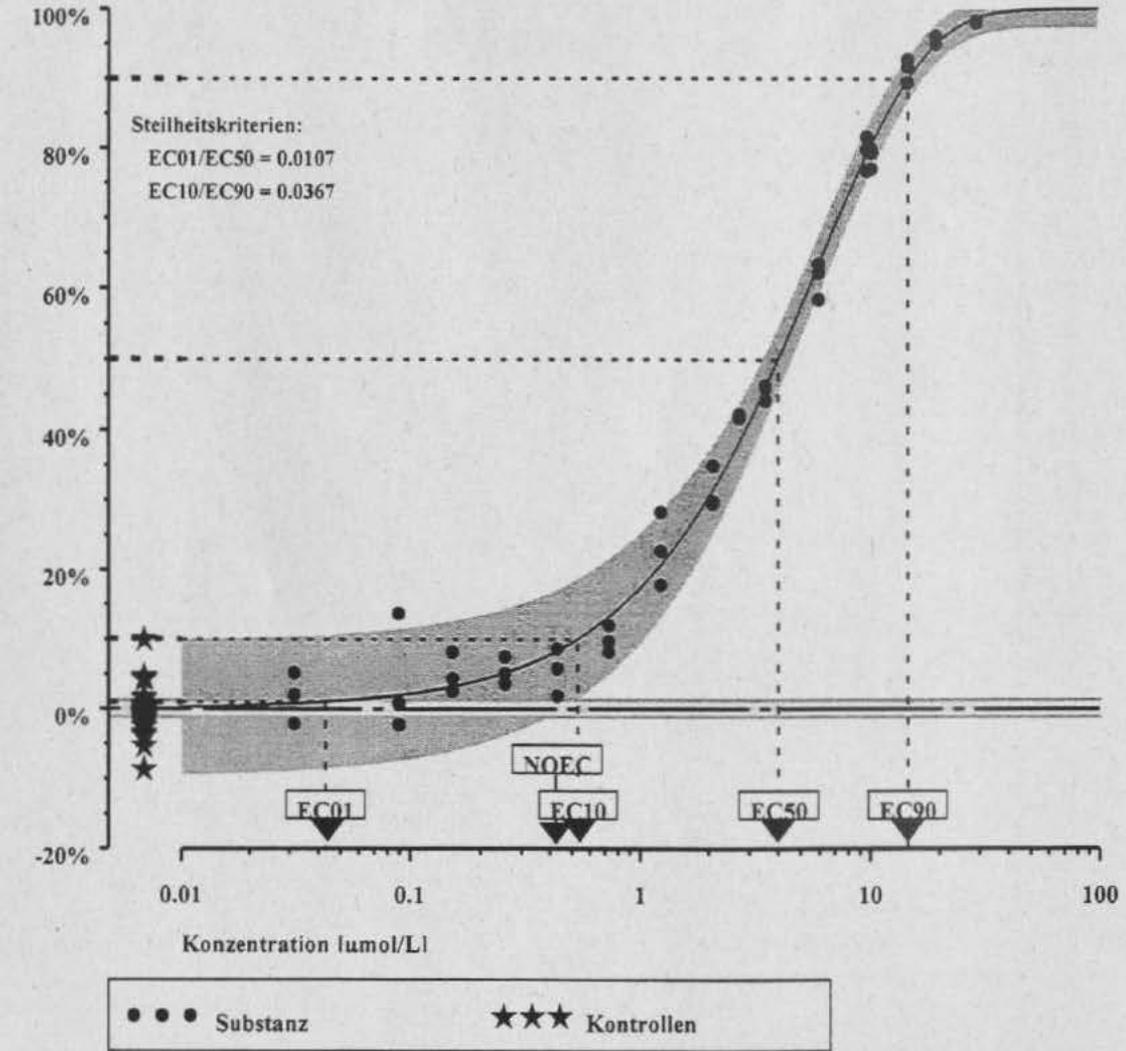
45 Wirksamkeitsdaten und 23 Kontrollen

Box-Cox-Weibull: Wirkung = $1 - \exp(-\exp(6.612 + 5.780 * (((Konzentration^{**0.4716}) - 1) / 0.4716)))$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte umol/L: EC01 = 0.00540 [<0.0001 :0.05267] EC-Werte mg/L: EC01 = 0.00150 [0.00000:0.01463]
 EC10 = 0.06570 [0.04175:0.08579] EC10 = 0.01825 [0.01160:0.02383]
 EC50 = 0.16755 [0.15533:0.18667] EC50 = 0.04654 [0.04314:0.05185]
 EC90 = 0.25875 [0.22615:0.30860] EC90 = 0.07187 [0.06281:0.08571]
 NOEC = 0.0551 umol/L, LOEC = 0.0729 umol/L NOEC = 0.01530 mg/L, LOEC = 0.02025 mg/L

Metsulfuron-methyl

48 Wirkdaten und 36 Kontrollen

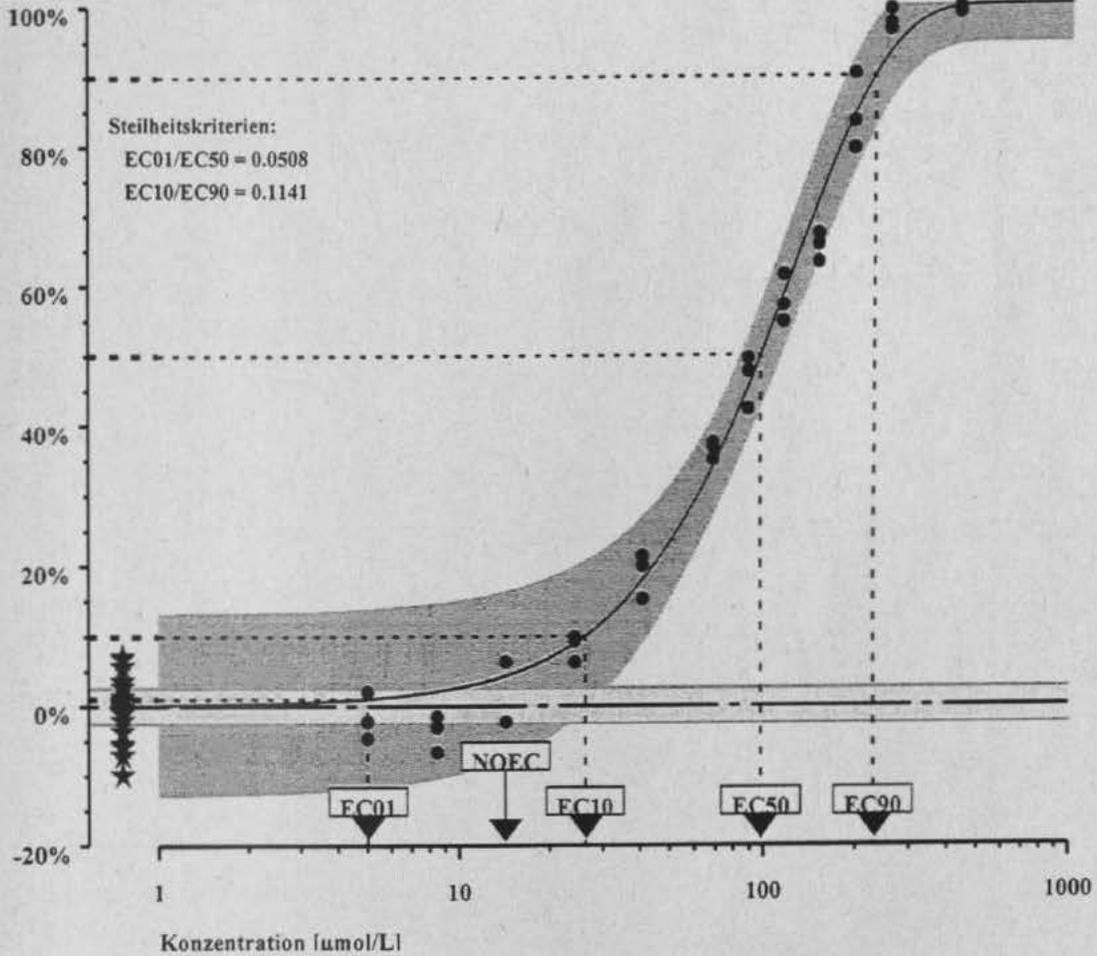
Weibull: Wirkung= $1-\exp(-\exp(-1.664+2.149*\log_{10}(\text{Konzentration})))$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte (umol/L): EC01 = 0.04303 [0.03340;0.05446] EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.01641 [0.01274;0.02077]
 EC10 = 0.53346 [0.46611;0.60034] EC10 = 0.20344 [0.17775;0.22895]
 EC50 = 4.01487 [3.83114;4.18154] EC50 = 1.53111 [1.46104;1.59467]
 EC90 = 14.5309 [13.8587;15.2948] EC90 = 5.54151 [5.28517;5.83282]

NOEC = 0.4335 umol/l. LOEC = 0.7326 umol/L NOEC = 0.16532 mg/L. LOEC = 0.27938 mg/L

Nalidixinsäure

36 Wirkdaten und 17 Kontrollen

Weibull: Wirkung = $1 - \exp(-\exp(-6.890 + 3.271 \cdot \log_{10}(\text{Konzentration})))$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 5.01189 [3.58718;6.86023] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 1.16396 [0.83309;1.59322]

EC10 = 26.2016 [22.2460;30.4049]

EC10 = 6.08505 [5.16640;7.06124]

EC50 = 98.6778 [94.3190;103.629]

EC50 = 22.9169 [21.9047;24.0668]

EC90 = 229.734 [210.498;250.704]

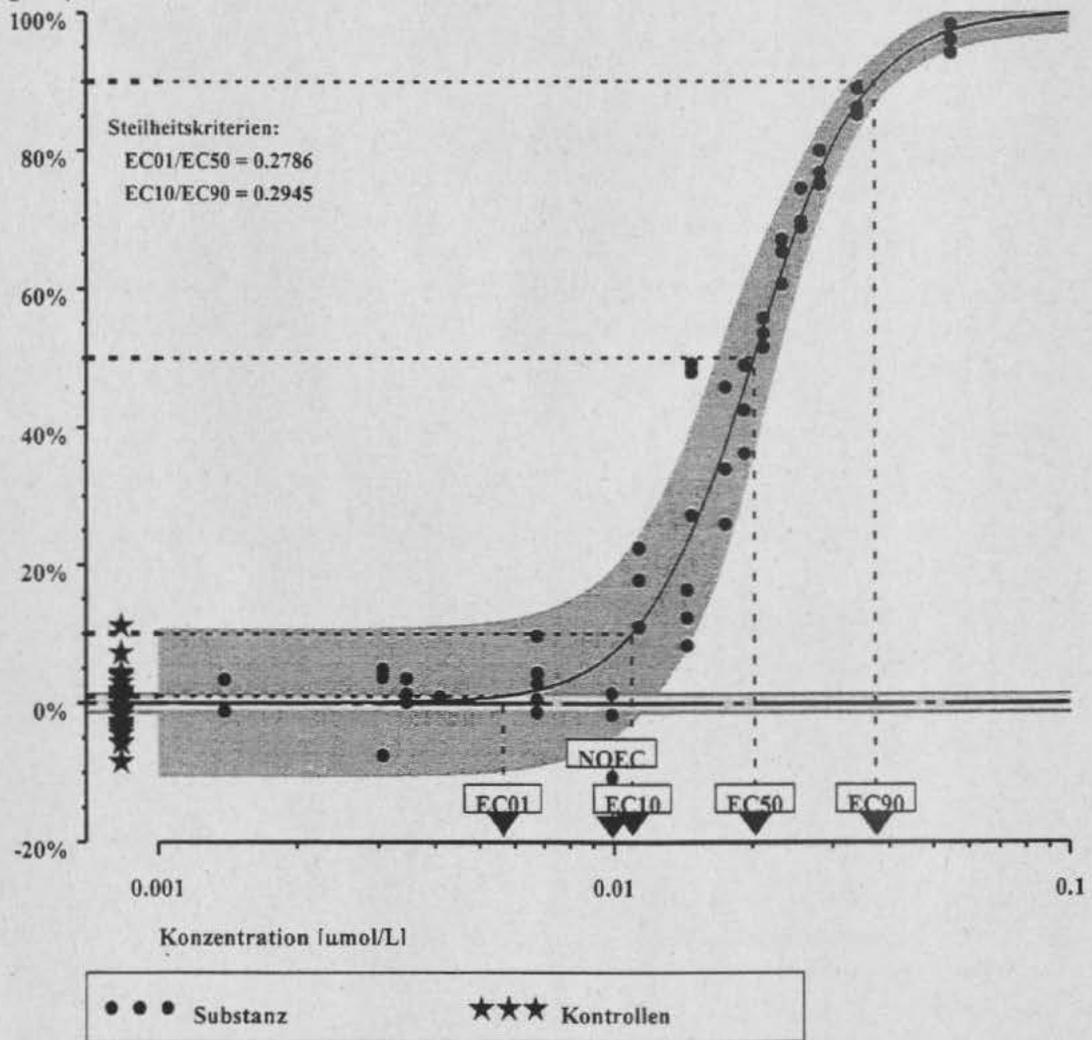
EC90 = 53.3534 [48.8860;58.2236]

NOEC = 14.318 umol/l. LOEC = 24.198 umol/L

NOEC = 3.32521 mg/L. LOEC = 5.61974 mg/L

Norflurazon

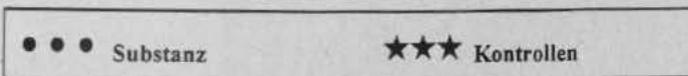
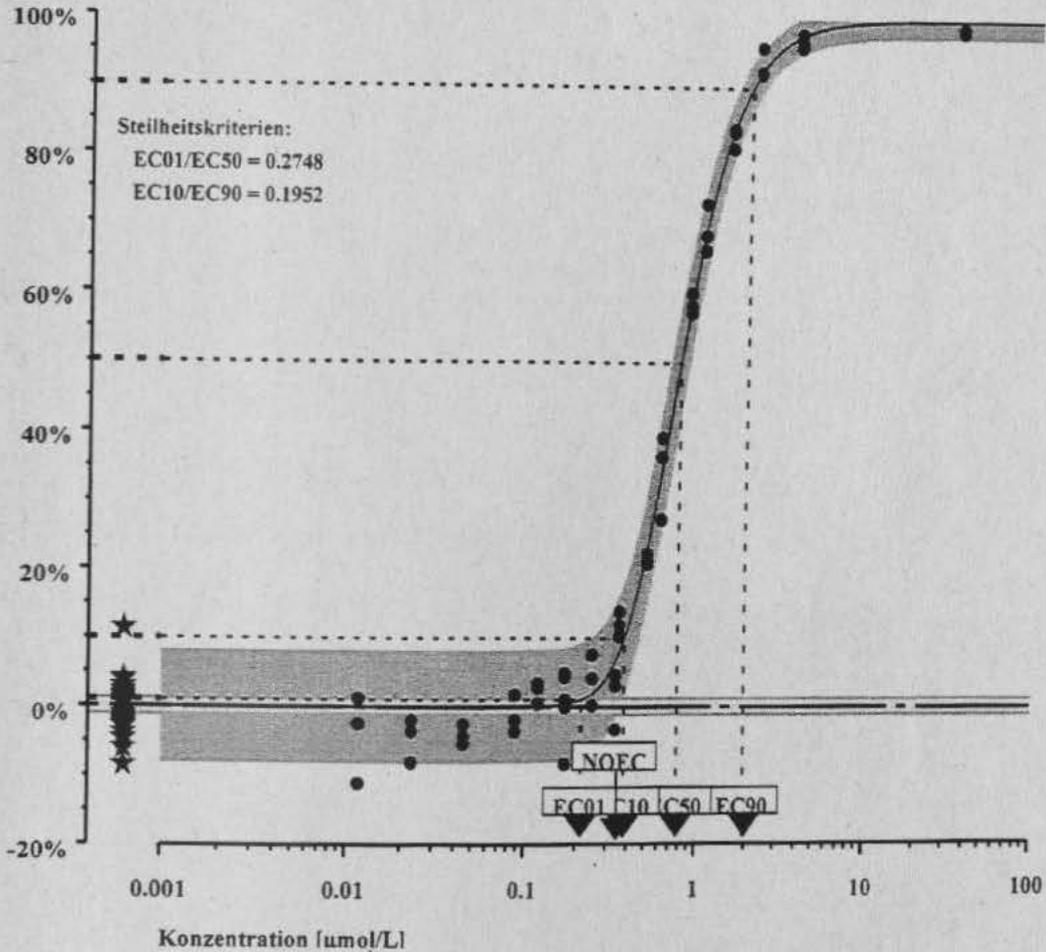
51 Wirkdaten und 36 Kontrollen

Logit: $Wirkung = 1 / (1 + \exp(-14.018 + 8.278 * (\log_{10}(\text{Konzentration}))))$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.00564 [0.00482:0.00646] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00171 [0.00146:0.00196]
 EC10 = 0.01099 [0.01002:0.01187] EC10 = 0.00334 [0.00304:0.00360]
 EC50 = 0.02026 [0.01953:0.02093] EC50 = 0.00615 [0.00593:0.00636]
 EC90 = 0.03733 [0.03558:0.03950] EC90 = 0.01133 [0.01081:0.01199]
 NOEC = 0.0099 umol/l. LOEC = 0.0114 umol/L NOEC = 0.00301 mg/L. LOEC = 0.00346 mg/L

Paraquat

54 Wirkdaten und 36 Kontrollen

G.Logit: Wirkung= $1/(1+\exp(-(-1.673+5.019*(\log_{10}(\text{Konzentration}))))))^{**}2.4876$ Hemmung der
Algenreproduktion

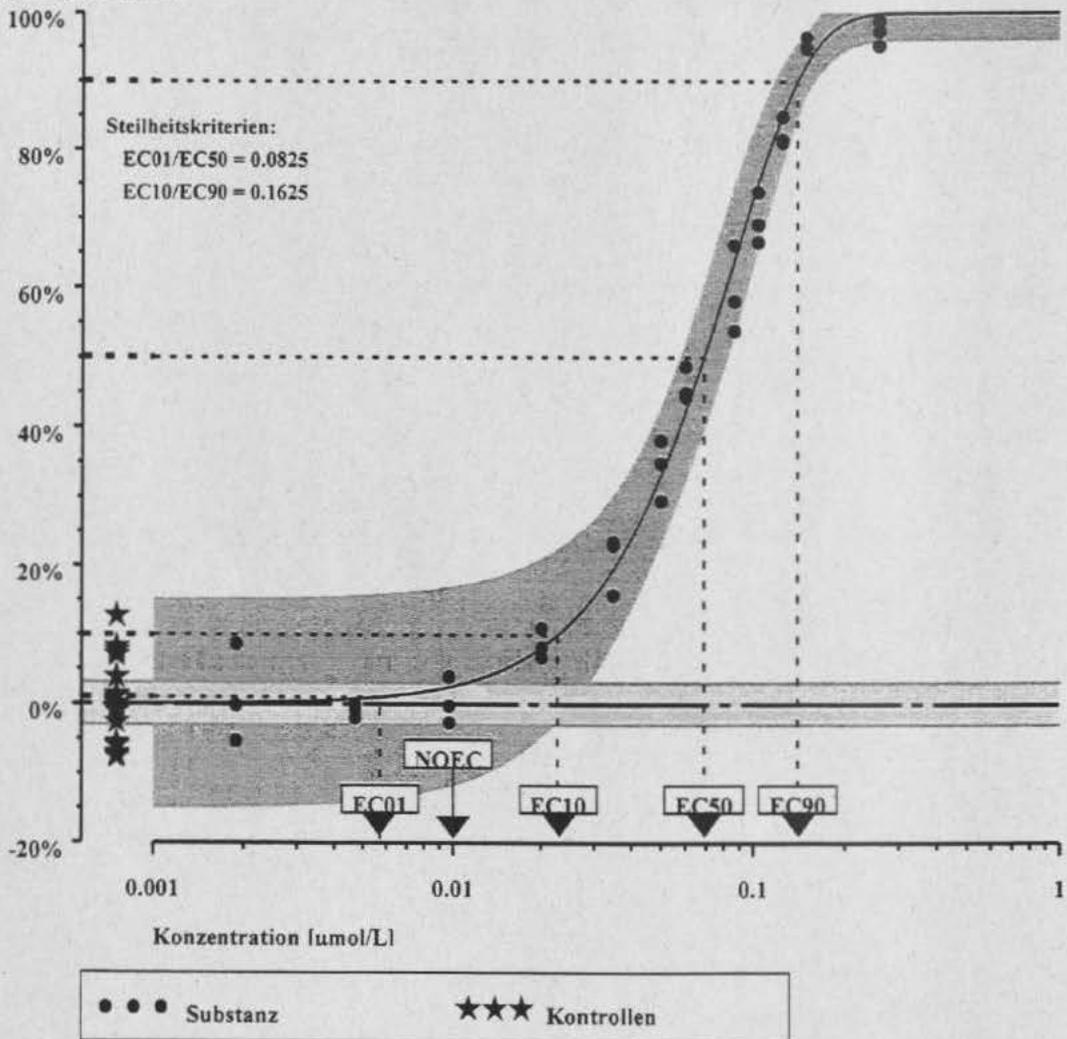
EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.21466 [0.13267;0.28309] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.06680 [0.04129;0.08810]
 EC10 = 0.38255 [0.34078;0.41706] EC10 = 0.11905 [0.10605;0.12979]
 EC50 = 0.78121 [0.74943;0.82733] EC50 = 0.24312 [0.23323;0.25747]
 EC90 = 1.96012 [1.78602;2.20116] EC90 = 0.61001 [0.55583;0.68502]

NOEC = 0.3396 umol/L. LOEC = 0.3560 umol/L NOEC = 0.10569 mg/L. LOEC = 0.11079 mg/L

Terbuthvlazin

36 Wirkdaten und 18 Kontrollen

Weibull: Wirkung=1-exp(-exp(4.165+3.908*log10(Konzentration)))

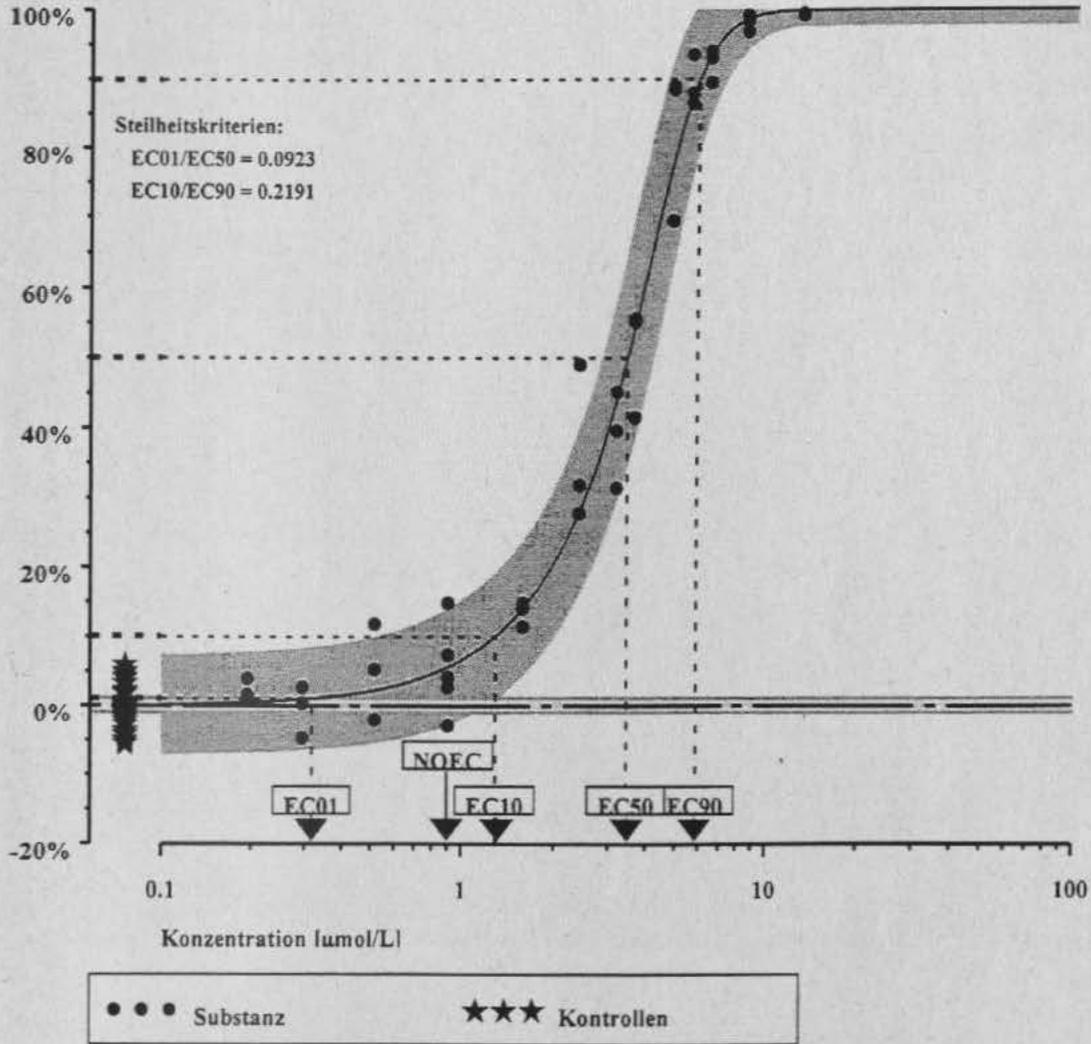
Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte (umol/L): EC01 = 0.00572 (0.00438:0.00735) EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.00131 (0.00101:0.001691)
 EC10 = 0.02283 (0.01981:0.02586) EC10 = 0.00524 (0.00455:0.00594)
 EC50 = 0.06926 (0.06575:0.07250) EC50 = 0.01591 (0.01510:0.016651)
 EC90 = 0.14051 (0.13326:0.14775) EC90 = 0.03228 (0.03061:0.033941)

NOEC = 0.0097 umol/l. LOEC = 0.0202 umol/L NOEC = 0.00223 mg/L. LOEC = 0.00464 mg/L

Triadimenol

42 Wirkdaten und 36 Kontrollen

G.Logit: Wirkung= $1/(1+\exp(-(-9.993+13.972*(\log_{10}(\text{Konzentration}))))))^{**0.2721}$ Hemmung der
Algenreproduktion

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.31903 | 0.20626; 0.53250 | EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.09436 | 0.06100; 0.15750 |
 EC10 = 1.28687 | 1.08753; 1.53821 | EC10 = 0.38062 | 0.32166; 0.45496 |
 EC50 = 3.45710 | 3.25329; 3.72039 | EC50 = 1.02251 | 0.96223; 1.10038 |
 EC90 = 5.87226 | 5.47022; 6.38147 | EC90 = 1.73684 | 1.61793; 1.88745 |

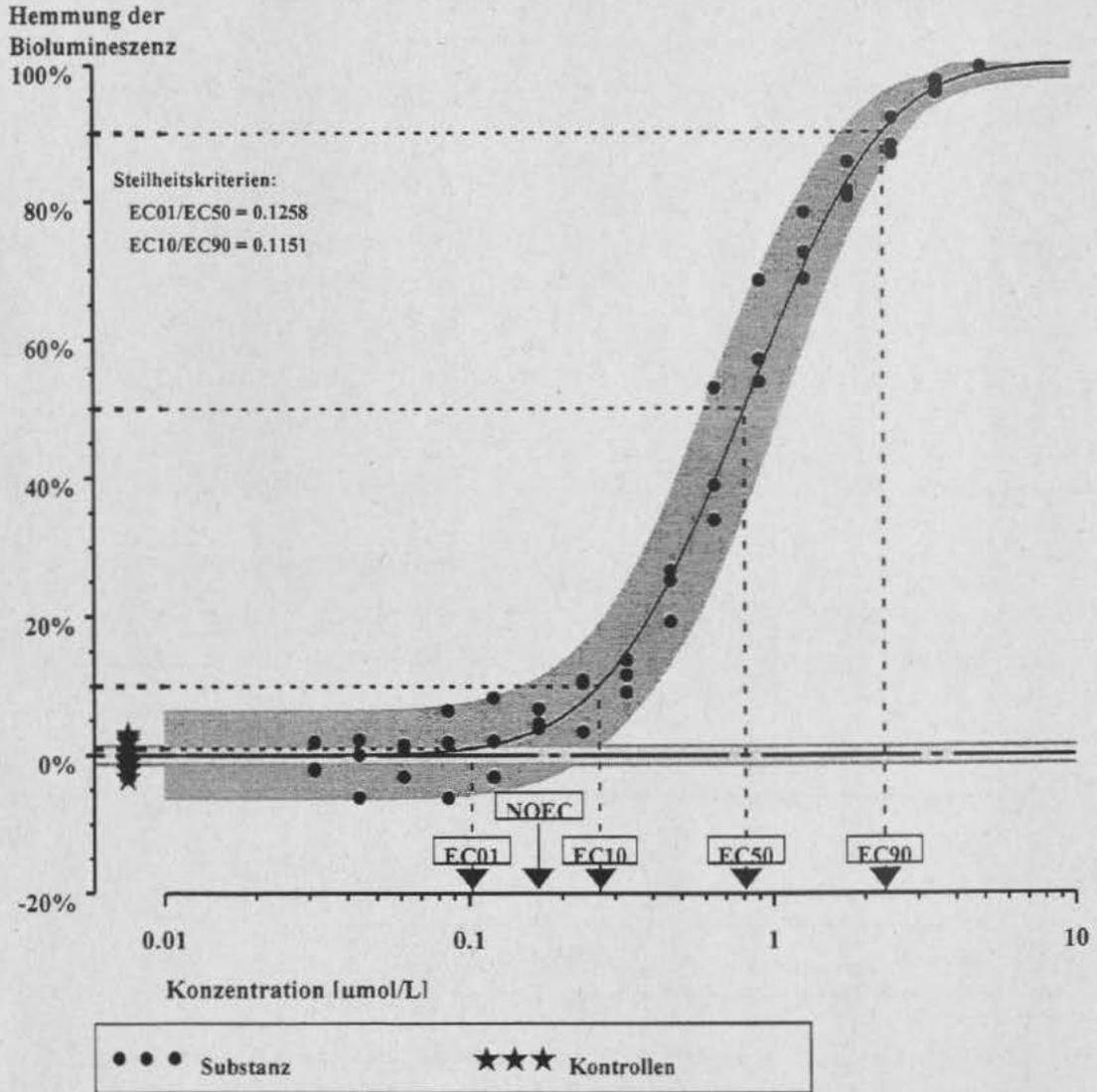
NOEC = 0.9044 umol/l. LOEC = 1.5818 umol/L NOEC = 0.26749 mg/L. LOEC = 0.46785 mg/L

D1.3 Bakterientoxizität der 16 Substanzen *ähnlicher* Wirkung (Entkoppler)

CCCP

48 Wirkdaten und 11 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(0.247+1.200*(((Konzentration**0.0544)-1)/0.0544))



EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.10231 (0.05689;0.148091)

EC10 = 0.26719 (0.22595;0.309271)

EC50 = 0.81303 (0.73892;0.891261)

EC90 = 2.32169 (2.14141;2.54187)

NOEC = 0.169 umol/L. LOEC = 0.2366 umol/L

EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.02093 (0.01164;0.030301)

EC10 = 0.05467 (0.04623;0.063281)

EC50 = 0.16635 (0.15118;0.182351)

EC90 = 0.47502 (0.43813;0.520071)

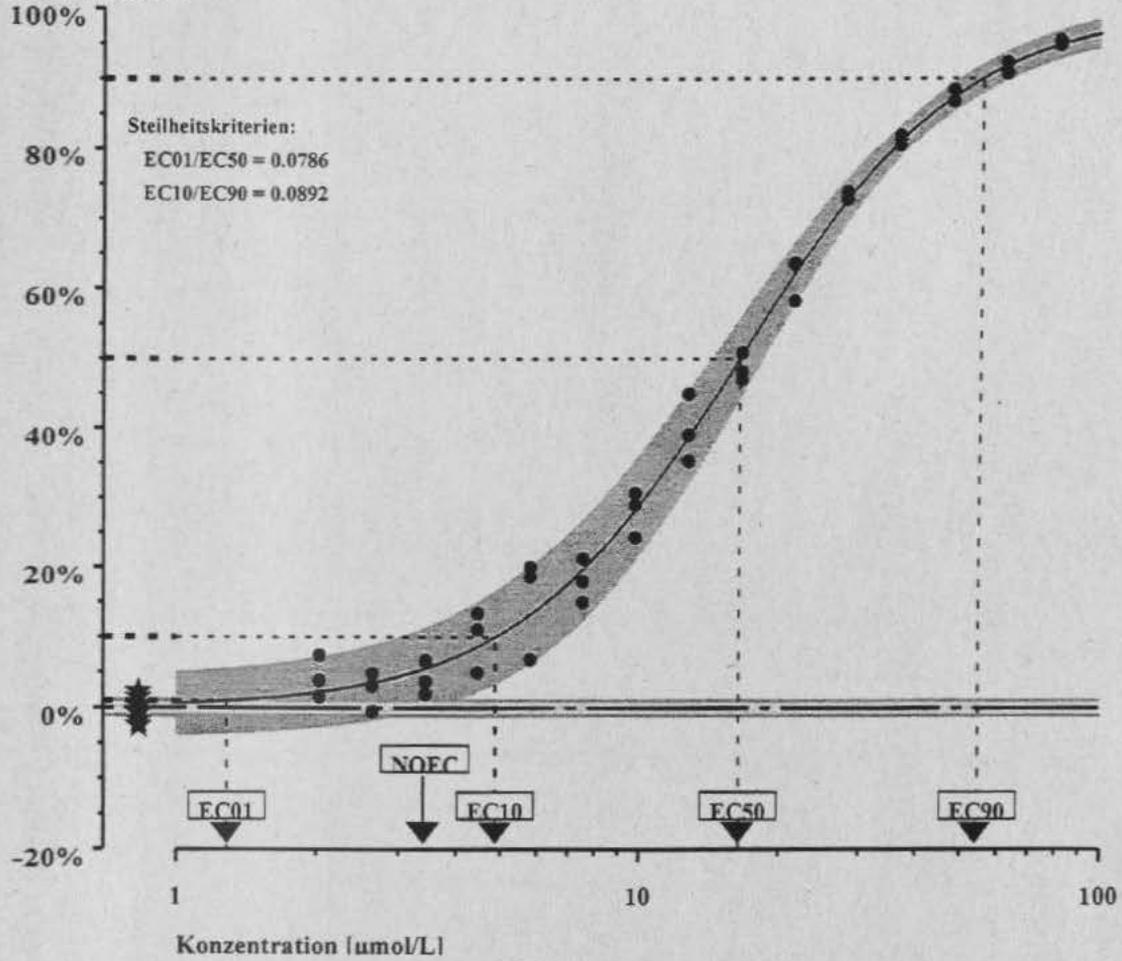
NOEC = 0.03458 mg/L. LOEC = 0.04841 mg/L

Dinoseb

48 Wirksamkeitsdaten und 12 Kontrollen

Box-Cox-Logit: $Wirkung = 1 / (1 + \exp(-(-5.050 + 1.793 * ((Konzentration^{**0.0049}) - 1) / 0.0049))))$

Hemmung der Biolumineszenz

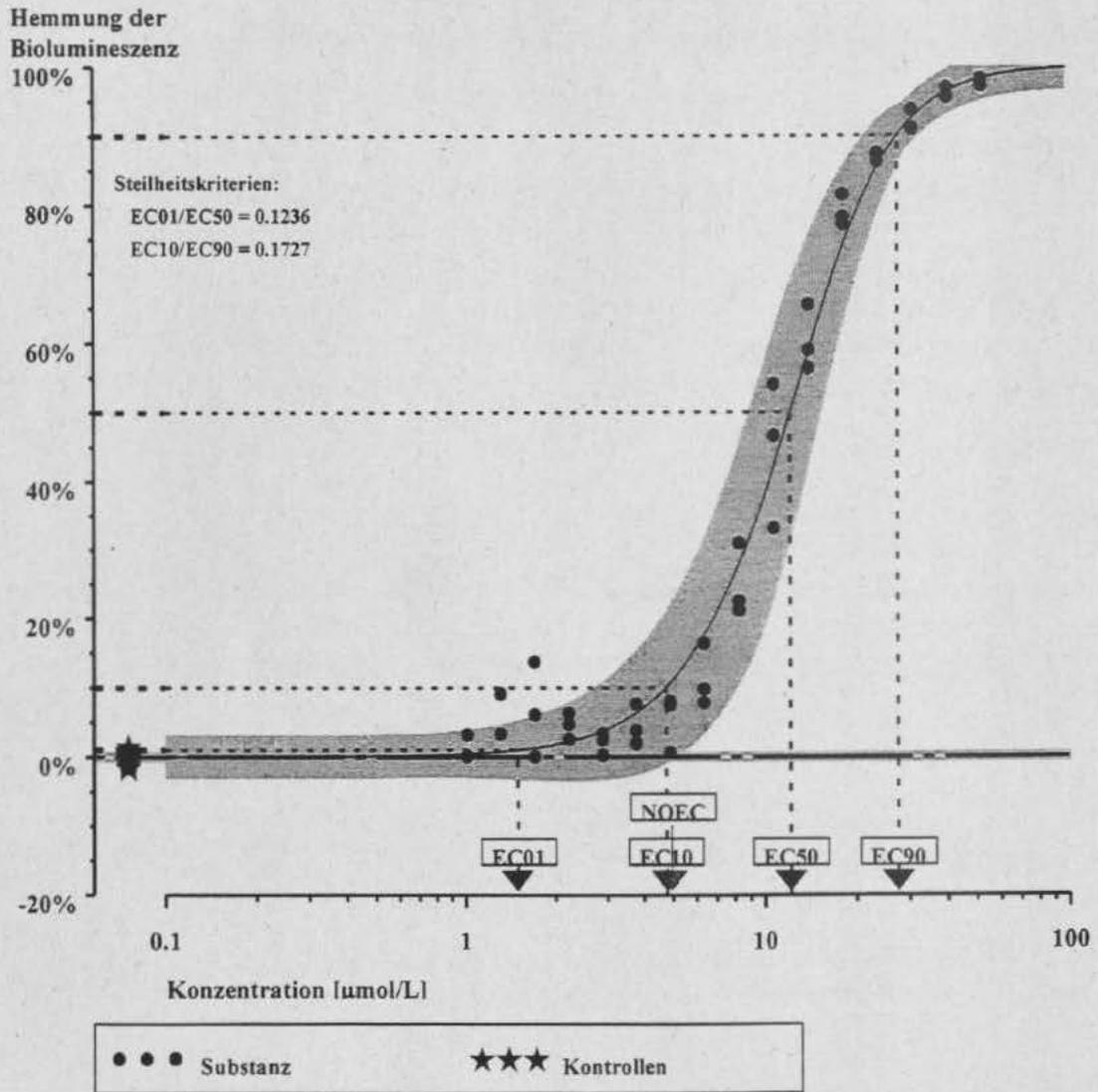


●●● Substanz ★★ ★ Kontrollen

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 1.28867 0.87706; 1.79843	EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.30956 0.21069; 0.43202
EC10 = 4.87900 4.34703; 5.43083	EC10 = 1.17203 1.04424; 1.30459
EC50 = 16.3994 15.8441; 16.9906	EC50 = 3.93947 3.80608; 4.08147
EC90 = 54.7275 52.4368; 56.8265	EC90 = 13.1466 12.5964; 13.6509
NOEC = 3.4361 umol/L. LOEC = 4.467 umol/L	NOEC = 0.82542 mg/L. LOEC = 1.07306 mg/L

Dinoterb

48 Wirkdaten und 12 Kontrollen

G. Logit: $Wirkung = 1 / (1 + \exp(-(-7.705 + 6.621 * (\log_{10}(\text{Konzentration}))))))^{**0.7056}$ 

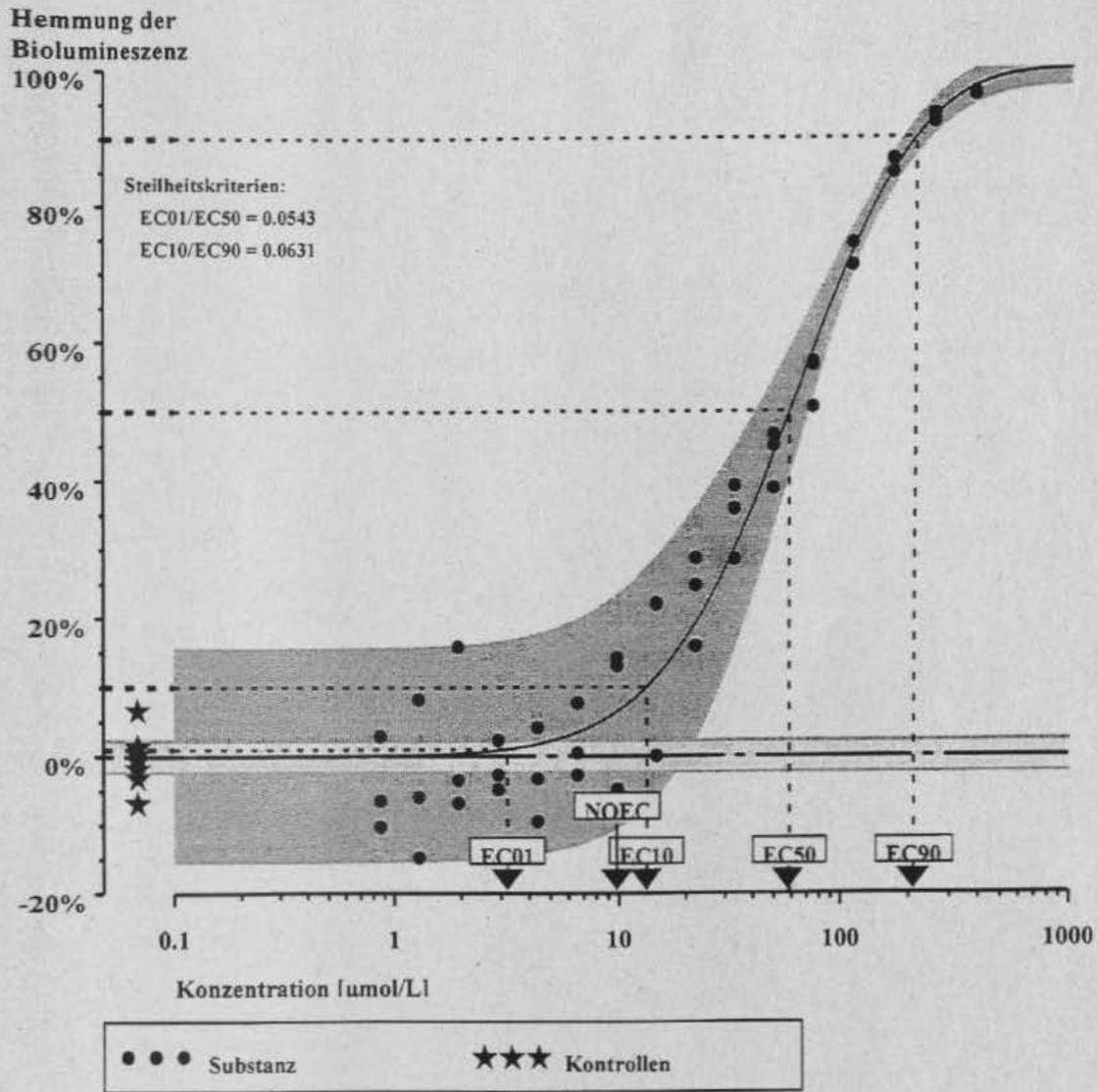
EC-Werte [umol/L]: EC01 = 1.50748 [0.96192:2.36031]
EC10 = 4.75150 [4.16566:5.59051]
EC50 = 12.1989 [11.0641:13.2499]
EC90 = 27.5209 [25.5715:29.4613]
NOEC = 4.9069 umol/L. LOEC = 6.379 umol/L

EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.36213 [0.23107:0.56699]
EC10 = 1.14141 [1.00068:1.34295]
EC50 = 2.93041 [2.65783:3.18288]
EC90 = 6.61106 [6.14278:7.07719]
NOEC = 1.17874 mg/L. LOEC = 1.53236 mg/L

DNOC

47 Wirkdaten und 11 Kontrollen

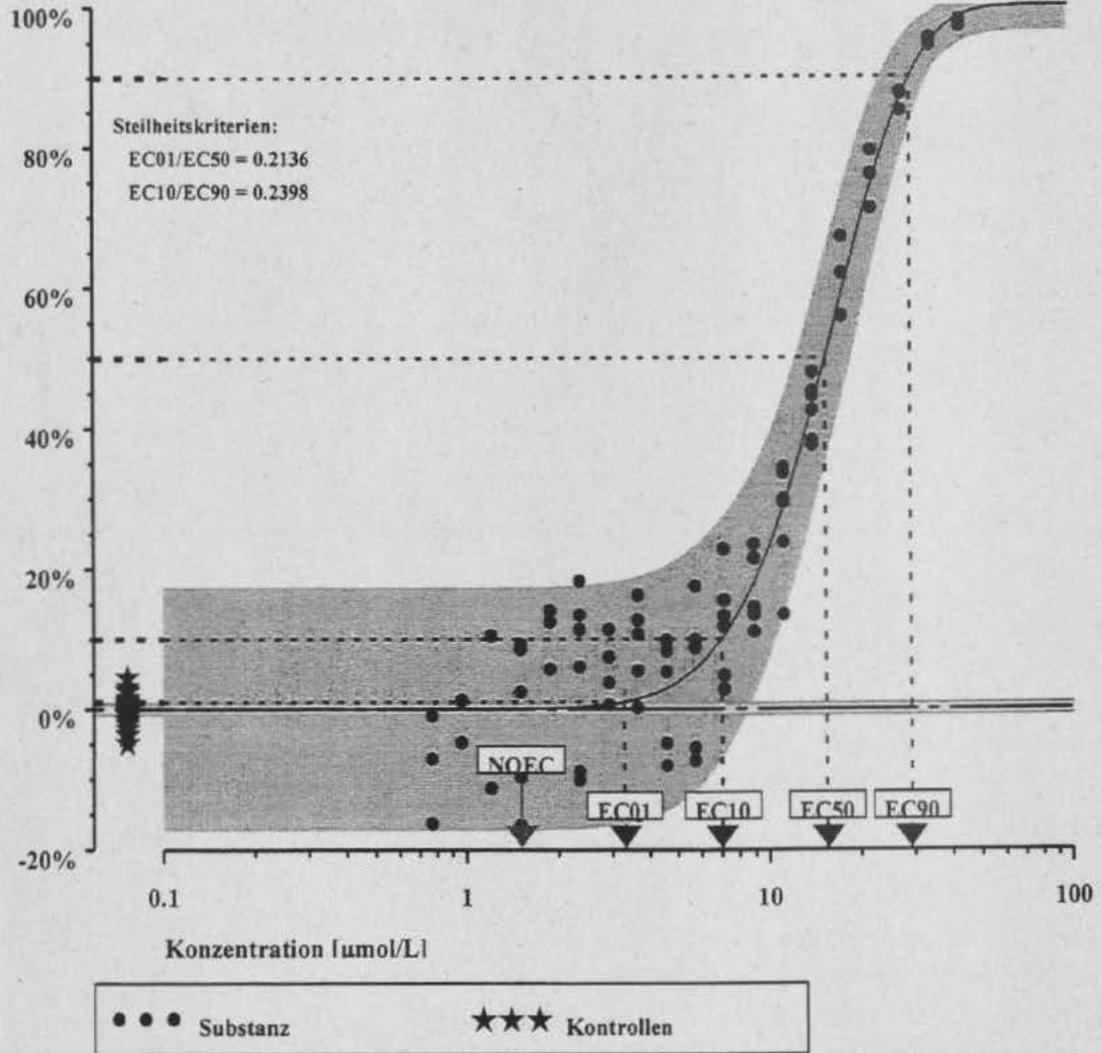
Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(-3.065+0.594*(((Konzentration**0.1111)-1)/0.1111))



EC-Werte (umol/L): EC01 = 3.20154 (0.85254;7.18315)	EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.63 (0.17;1.42)
EC10 = 13.3201 (9.38813;18.5287)	EC10 = 2.64 (1.85;3.67)
EC50 = 58.9465 (54.1563;63.1632)	EC50 = 11.68 (10.73;12.52)
EC90 = 211.187 (200.084;224.602)	EC90 = 41.85 (39.65;44.50)
NOEC = 9.8467 umol/L. LOEC = 14.77 umol/L	NOEC = 1.95 mg/L. LOEC = 2.93 mg/L

2,4-Dinitro-1-naphtol

88 Wirkdaten und 29 Kontrollen

Box-Cox-Weibull: Wirkung= $1-\exp(-\exp(-9.790+5.290*(((\text{Konzentration}^{**}-0.3401)-1)/-0.3401)))$ Hemmung der
Biolumineszenz

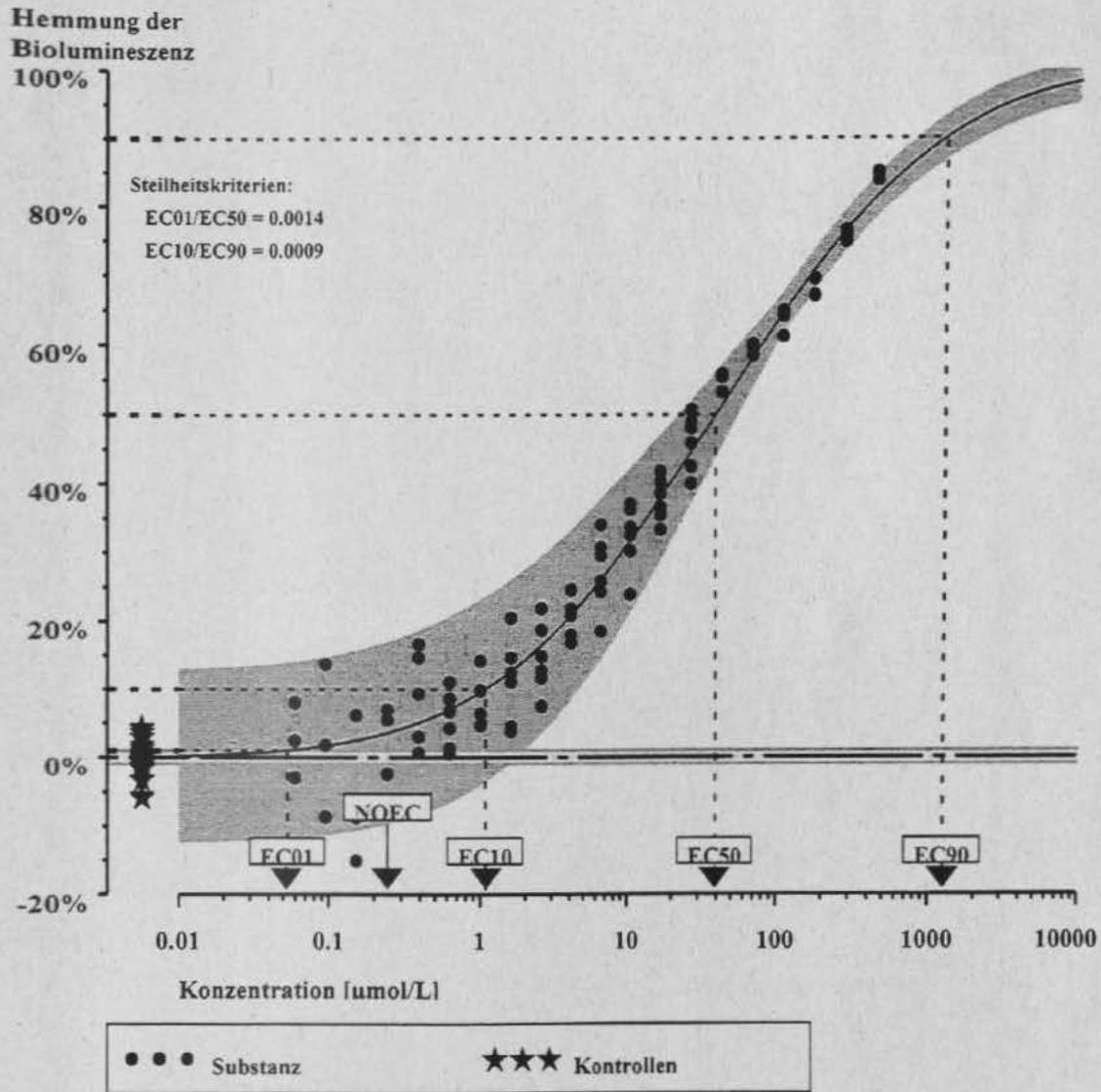
EC-Werte [umol/L]: EC01 = 3.29838 [1.83382;4.67831]
EC10 = 7.02350 [6.02419;8.12359]
EC50 = 15.4387 [14.5745;16.3991]
EC90 = 29.2948 [27.4750;31.4887]
NOEC = 1.5025 umol/L. LOEC = 1.8781 umol/L

EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.77238 [0.42943;1.09552]
EC10 = 1.64469 [1.41069;1.90230]
EC50 = 3.61528 [3.41290;3.84017]
EC90 = 6.85997 [6.43383;7.37370]
NOEC = 0.35184 mg/L. LOEC = 0.43979 mg/L

2,4-Dinitrophenol

89 Wirkdaten und 29 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(-1.310+0.351*(((Konzentration**0.0093)-1)/0.0093))

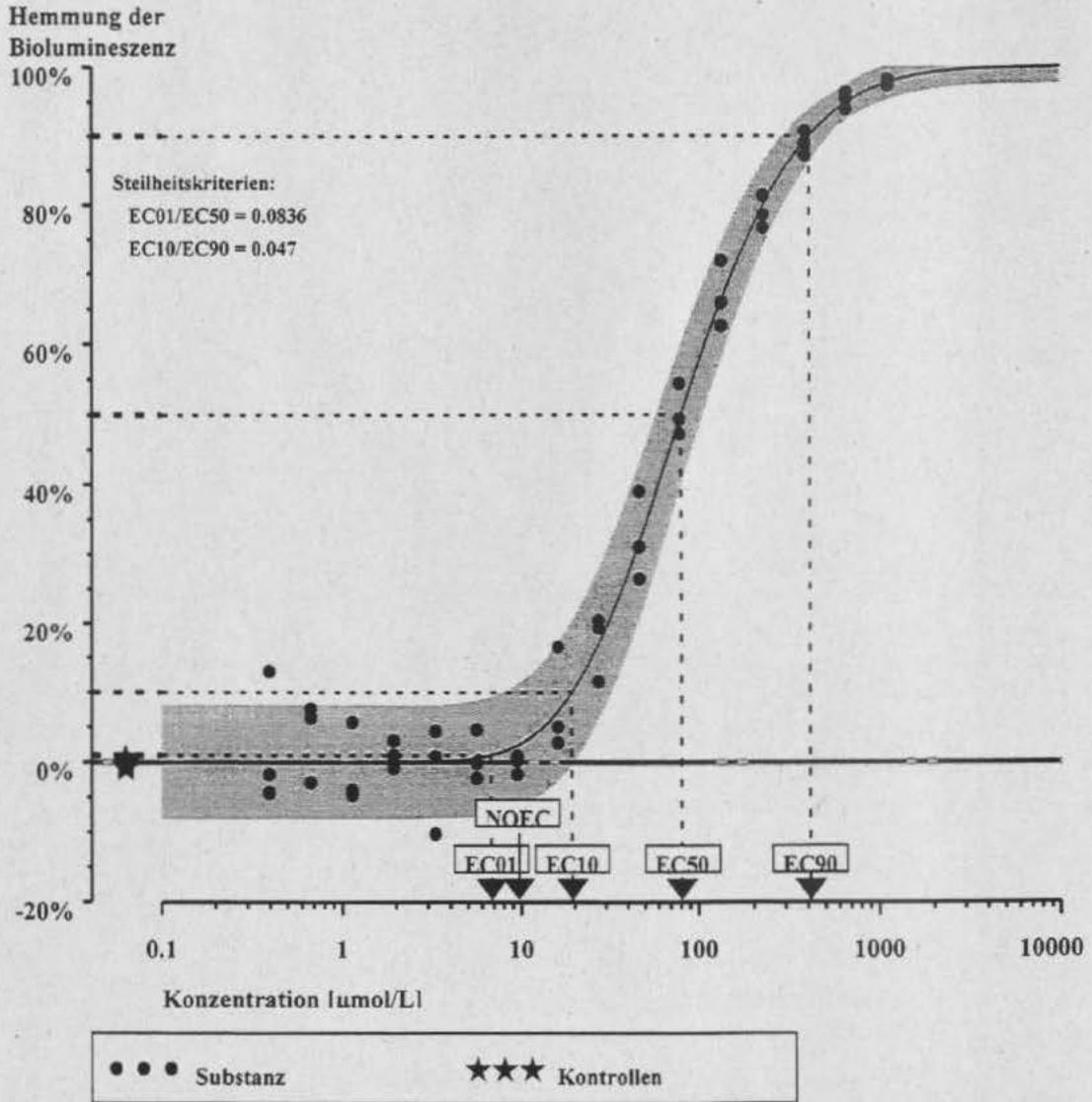


EC-Werte [umol/L]:	EC01 = 0.05318 [0.01167;0.14074]	EC-Werte [mg/L]:	EC01 = 0.00979 [0.00215;0.02591]
	EC10 = 1.08563 [0.71775;1.51363]		EC10 = 0.19987 [0.13214;0.27867]
	EC50 = 39.2353 [35.6432;43.4158]		EC50 = 7.22360 [6.56226;7.99328]
	EC90 = 1262.32 [951.104;1699.90]		EC90 = 232.406 [175.108;312.969]
NOEC = 0.2454 umol/L. LOEC = 0.3926 umol/L		NOEC = 0.04518 mg/L. LOEC = 0.07228 mg/L	

2,6-Dinitrophenol

48 Wirkdaten und 12 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(-4.484+1.220*(((Konzentration**-0.0842)-1)/-0.0842))

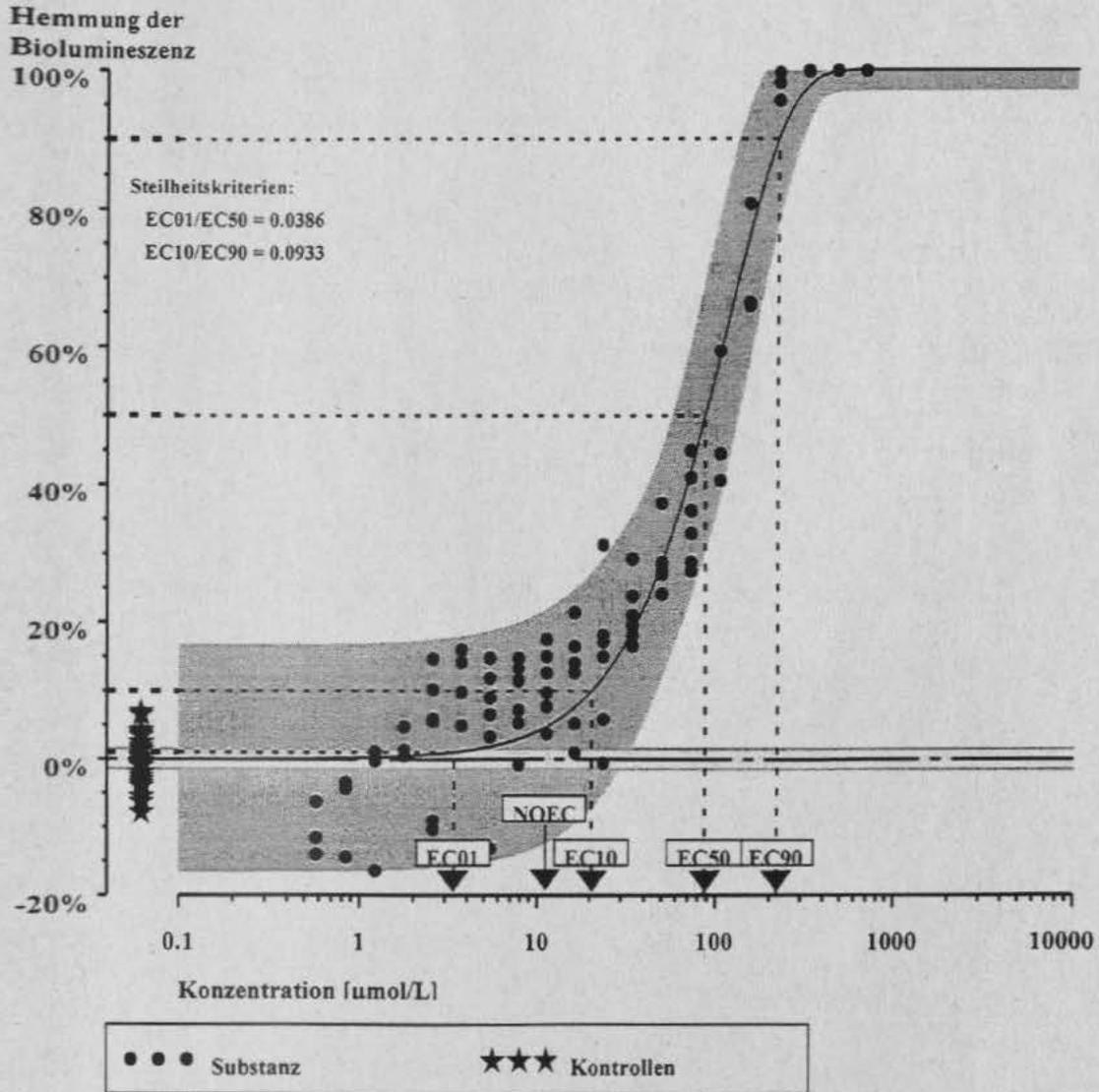


EC-Werte (umol/L): EC01 = 6.78030 [3.91990;10.9779]	EC-Werte (mg/L): EC01 = 1.24832 [0.72169;2.02115]
EC10 = 19.3949 [15.5152;24.4199]	EC10 = 3.57079 [2.85651;4.49595]
EC50 = 81.1046 [73.4949;88.4278]	EC50 = 14.9322 [13.5311;16.2804]
EC90 = 412.712 [372.091;456.675]	EC90 = 75.9845 [68.5056;84.0784]
NOEC = 9.5419 umol/L. LOEC = 16.221 umol/L	NOEC = 1.75676 mg/L. LOEC = 2.98645 mg/L

3,4-Dinitrophenol

90 Wirkdaten und 26 Kontrollen

Weibull: Wirkung=1-exp(-exp(-6.182+2.994*log10(Konzentration)))

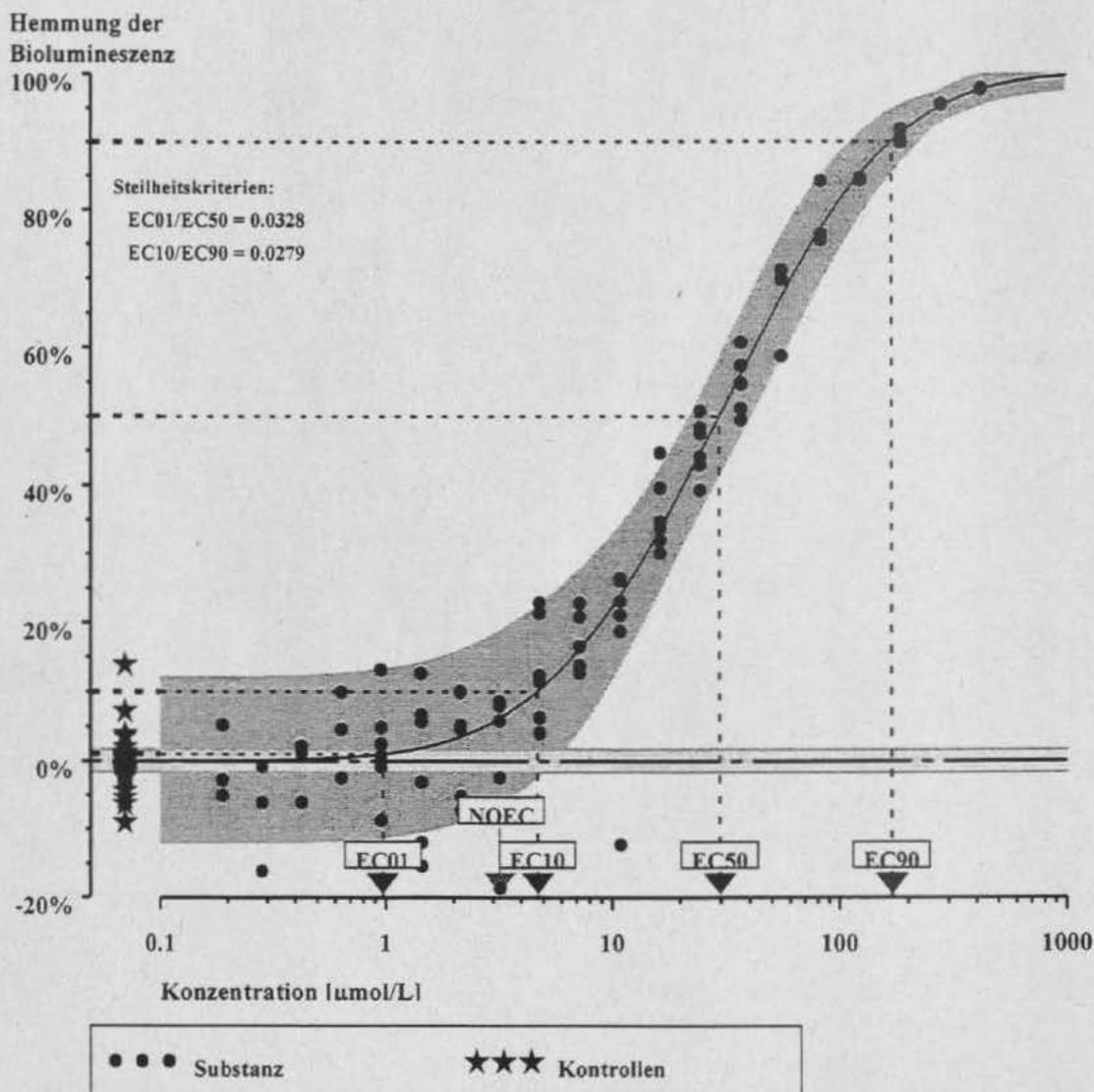


EC-Werte [umol/L]: EC01 = 3.37523 [2.14699;5.30912]	EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.62141 [0.39528;0.97746]
EC10 = 20.5619 [16.2984;25.4807]	EC10 = 3.78566 [3.00069;4.69125]
EC50 = 87.5424 [78.8334;95.9108]	EC50 = 16.1174 [14.5140;17.6581]
EC90 = 220.377 [188.594;254.527]	EC90 = 40.5737 [34.7220;46.8610]
NOEC = 11.3965 umol/L. LOEC = 11.3968 umol/L	NOEC = 2.09821 mg/L. LOEC = 2.09826 mg/L

2.6-Dinitro-4-methylphenol

90 Wirkdaten und 27 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(-2.311+0.647*(((Konzentration**0.0302)-1)/0.0302))



EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.97611 [0.45077;1.60822] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.19340 [0.08931;0.31864]

EC10 = 4.73243 [3.77359;5.72293]

EC10 = 0.93764 [0.74766;1.13388]

EC50 = 29.7607 [27.5489;32.4442]

EC50 = 5.89649 [5.45827;6.42817]

EC90 = 169.873 [152.599;187.251]

EC90 = 33.6569 [30.2345;37.1000]

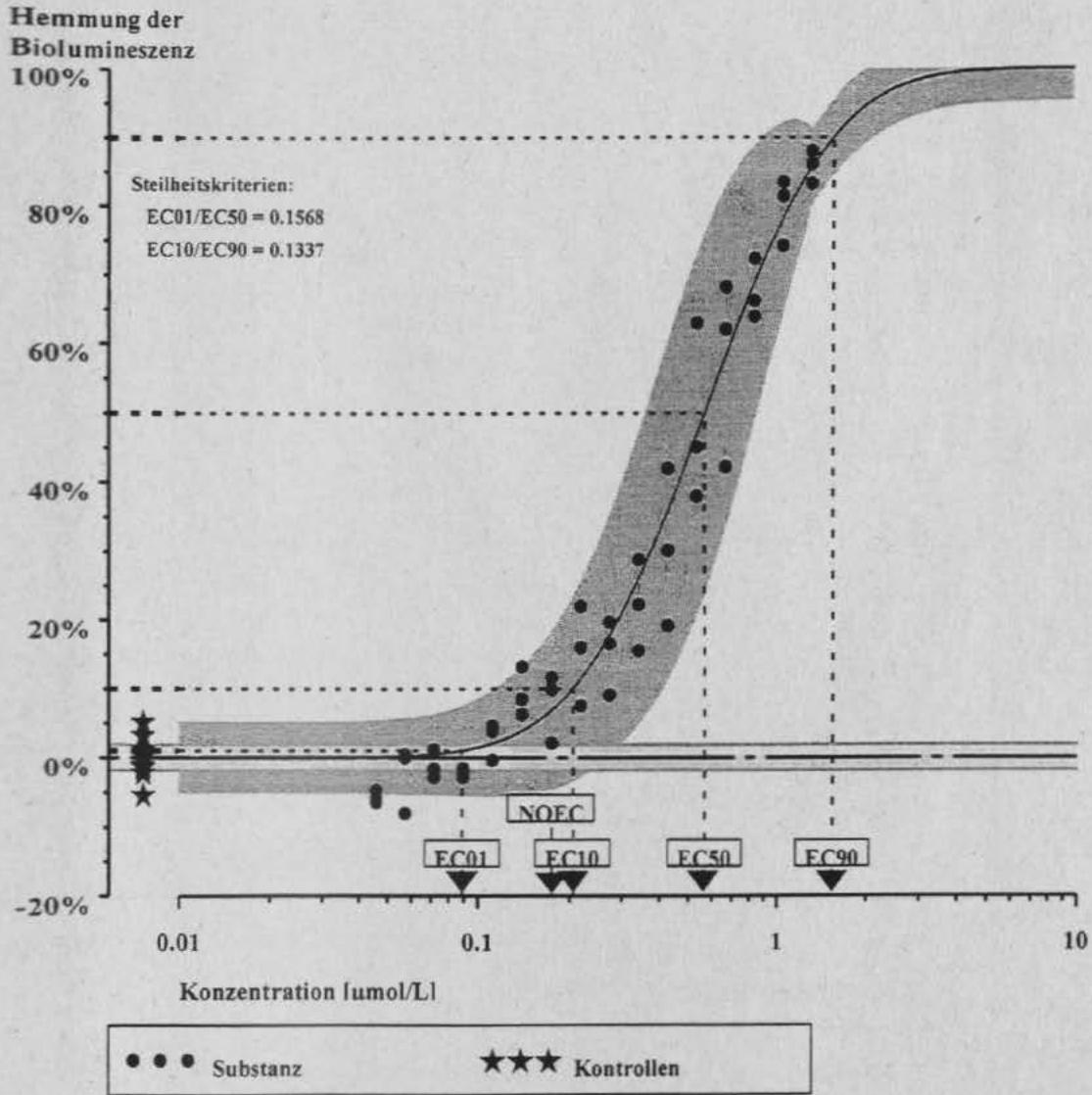
NOEC = 3.2417 umol/L. LOEC = 4.8624 umol/L

NOEC = 0.64228 mg/L. LOEC = 0.96339 mg/L

FCCP

48 Wirksamkeiten und 11 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(0.725+1.285*(((Konzentration**0.0156)-1)/0.0156))

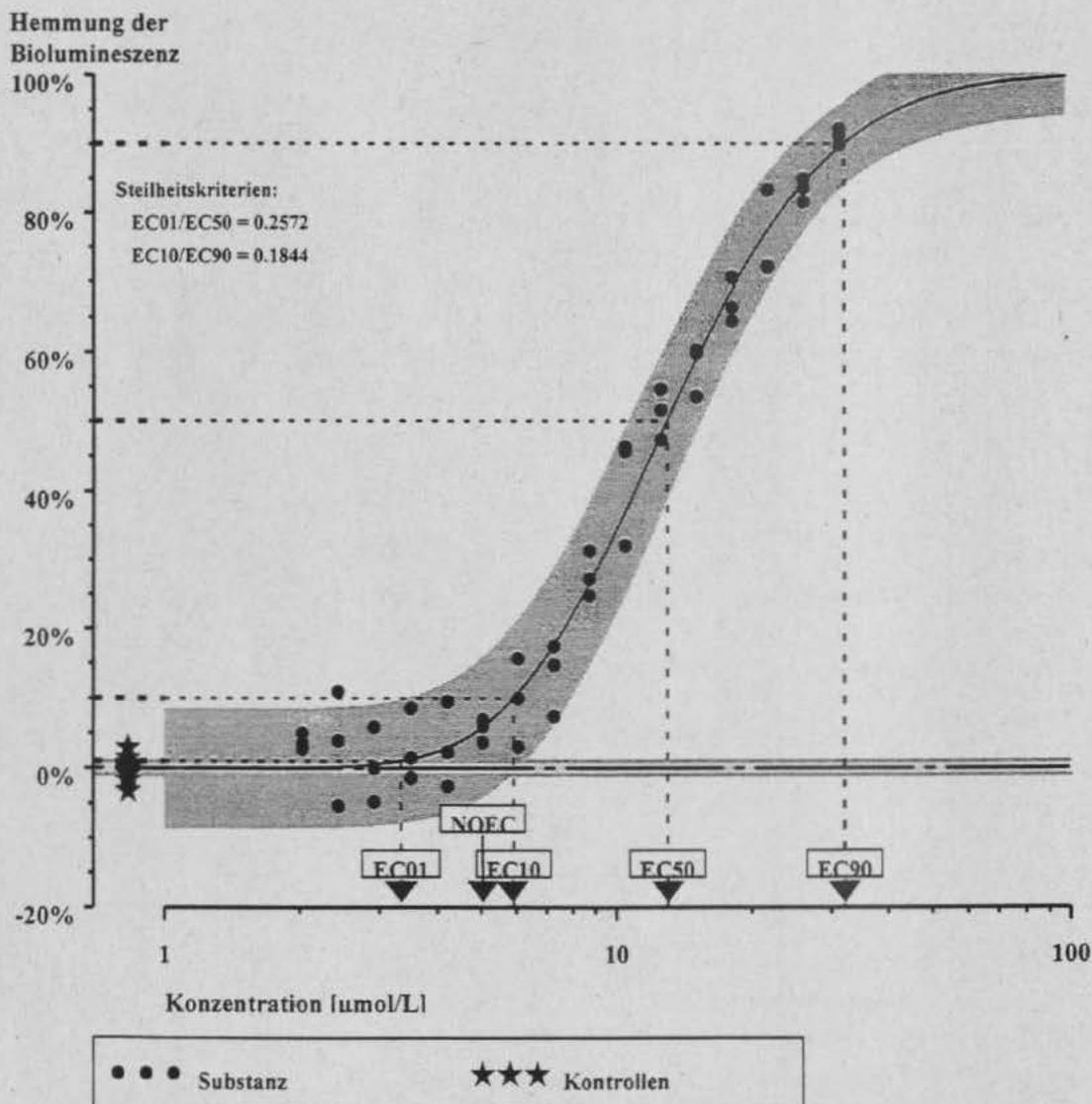


EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.08894 [0.04897:0.139291]	EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.01820 [0.01002:0.02850]
EC10 = 0.20578 [0.17439:0.243221]	EC10 = 0.04210 [0.03568:0.04976]
EC50 = 0.56733 [0.49498:0.649231]	EC50 = 0.11608 [0.10127:0.132831]
EC90 = 1.53960 [1.32060:2.073441]	EC90 = 0.31500 [0.27020:0.424231]
NOEC = 0.1752 umol/L. LOEC = 0.2189 umol/L	NOEC = 0.03585 mg/L. LOEC = 0.04479 mg/L

Pentachlorphenol

48 Wirkdaten und 12 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(-4.885+2.343*(((Konzentration**0.1671)-1)/-0.1671))



EC-Werte (umol/L): EC01 = 3.33944 (2.43336;4.31000) EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.88939 (0.64808;1.14788)

EC10 = 5.91715 (5.33901;6.62598) EC10 = 1.57591 (1.42194;1.76470)

EC50 = 12.9822 (12.2932;13.8434) EC50 = 3.45754 (3.27405;3.68692)

EC90 = 32.0821 (28.9480;37.5697) EC90 = 8.54444 (7.70971;10.0059)

NOEC = 5.0514 umol/l. LOEC = 6.0617 umol/L

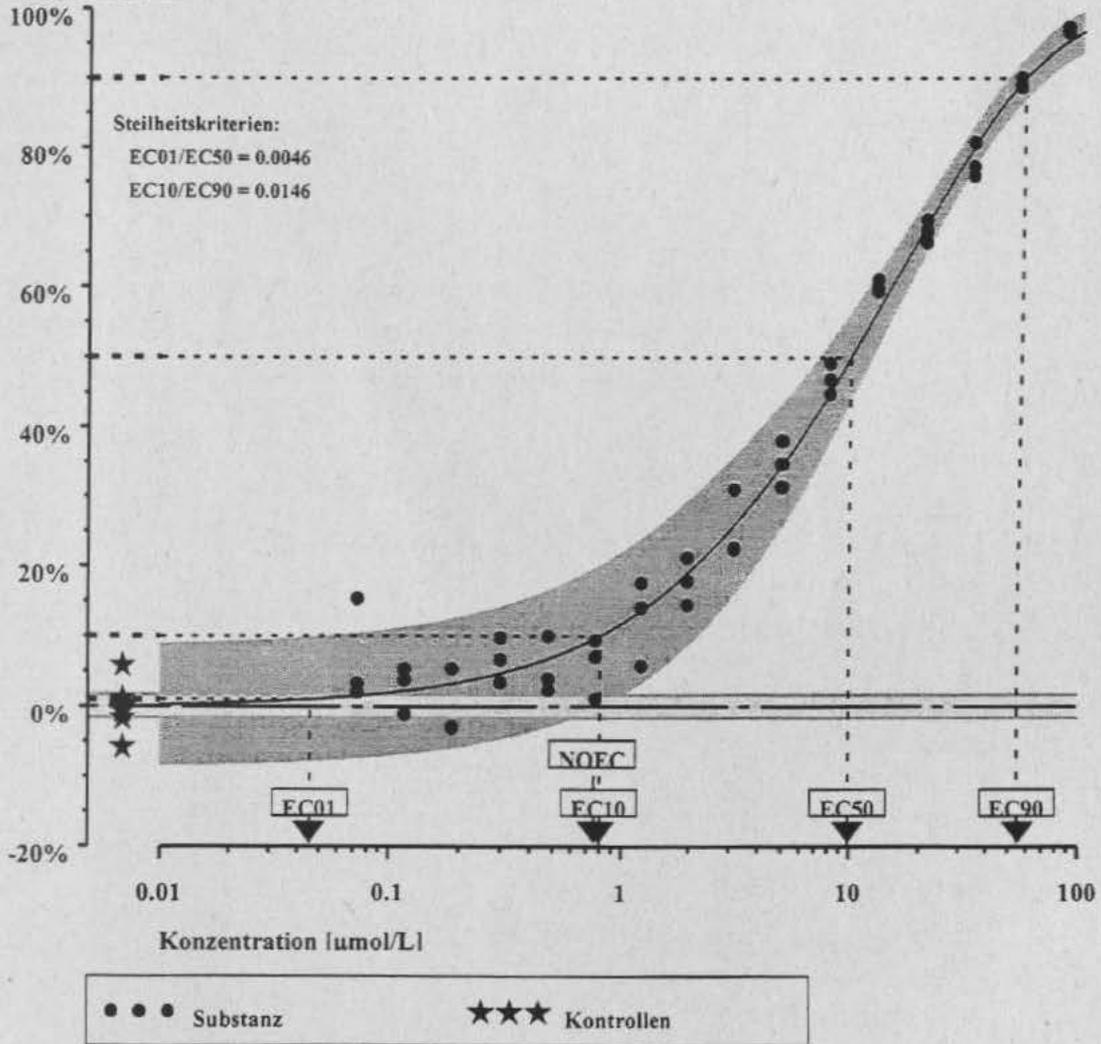
NOEC = 1.34534 mg/L. LOEC = 1.61441 mg/L

4-Phenylazophenol

48 Wirkdaten und 12 Kontrollen

Box-Cox-Weibull: Wirkung = $1 - \exp(-\exp(-2.079 + 0.776 * ((\text{Konzentration}^{**} - 0.0329) - 1) / -0.0329)))$

Hemmung der
Biolumineszenz

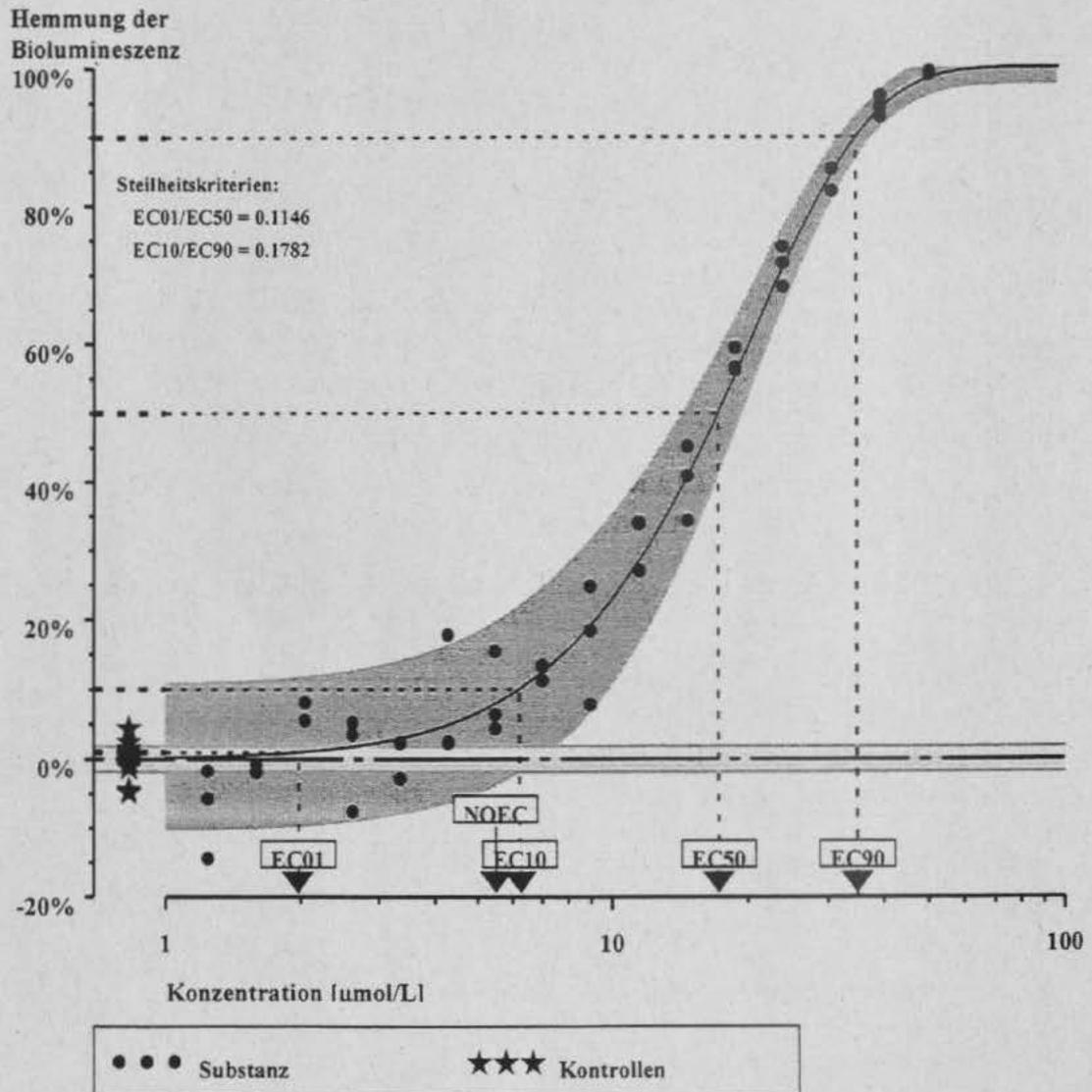


EC-Werte (umol/L): EC01 = 0.04559 [0.01114;0.12540] EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.00904 [0.00221;0.02486]
 EC10 = 0.80195 [0.55617;1.09756] EC10 = 0.15897 [0.11025;0.21757]
 EC50 = 9.88486 [9.15440;10.66751] EC50 = 1.95948 [1.81468;2.11462]
 EC90 = 54.9946 [50.8869;60.0813] EC90 = 10.9016 [10.0873;11.9099]

NOEC = 0.7647 umol/L LOEC = 1.2235 umol/L NOEC = . mg/L LOEC = 0.01445 mg/L

2,3,4-Trichlorphenol

48 Wirkdaten und 11 Kontrollen

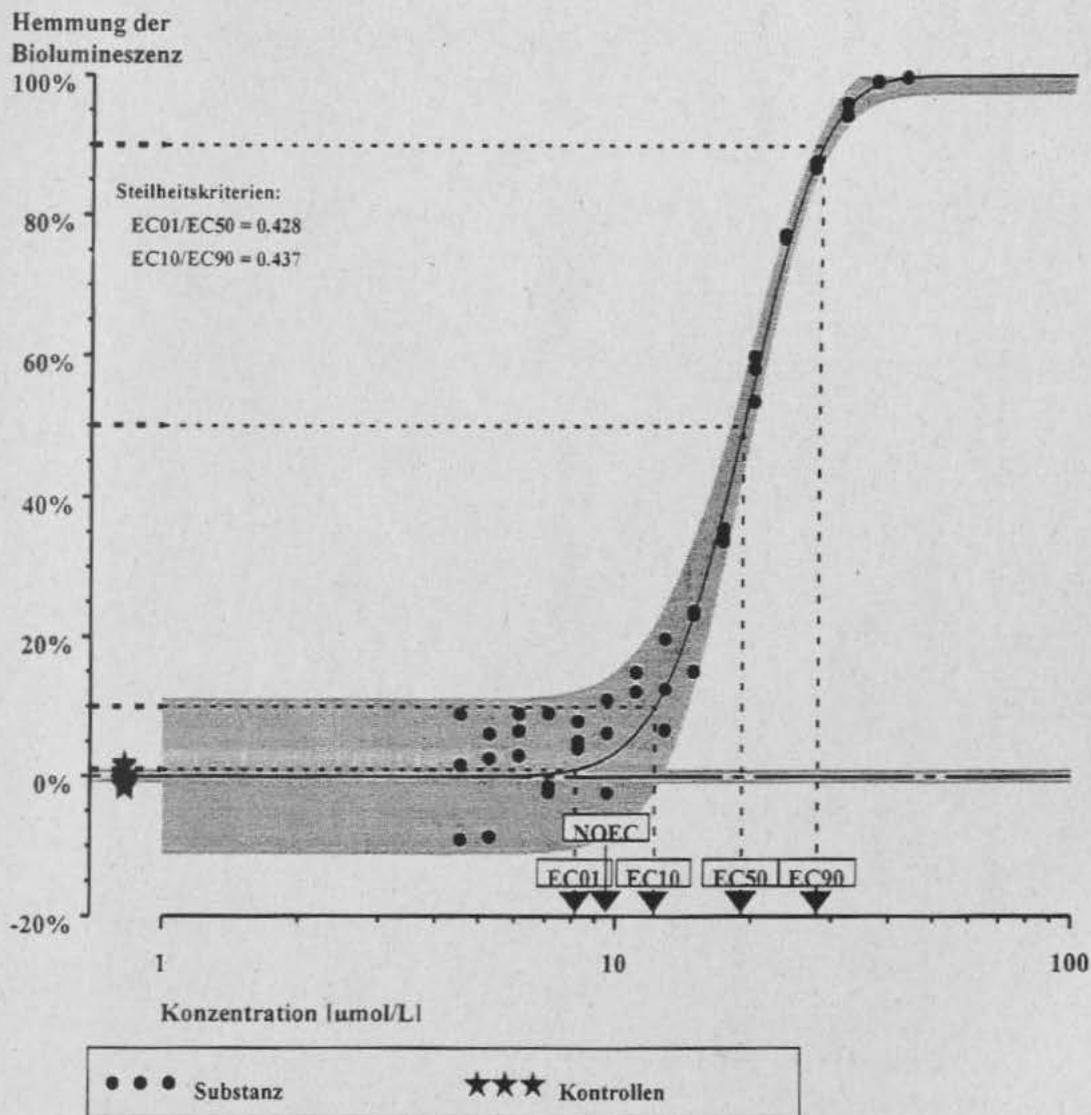
Box-Cox-Weibull: $Wirkung = 1 - \exp(-\exp(-6.124 + 2.308 * (((Konzentration^{**} - 0.0953) - 1) / -0.0953)))$ 

EC-Werte [umol/L]:	EC01 = 1.97745 [1.01392:3.30102]	EC-Werte [mg/L]:	EC01 = 0.3904 [0.2002:0.6518]
	EC10 = 6.22421 [5.16992:7.35160]		EC10 = 1.2290 [1.0208:1.4516]
	EC50 = 17.2486 [16.4320:18.0147]		EC50 = 3.4057 [3.2465:3.5570]
	EC90 = 34.9201 [33.6812:36.2784]		EC90 = 6.8950 [6.6504:7.1632]
NOEC = 5.491 umol/l.	LOEC = 7.0285 umol/L	NOEC = 1.0842 mg/L.	LOEC = 1.3878 mg/L

2.3.5-Trichlorphenol

46 Wirksamdaten und 11 Kontrollen

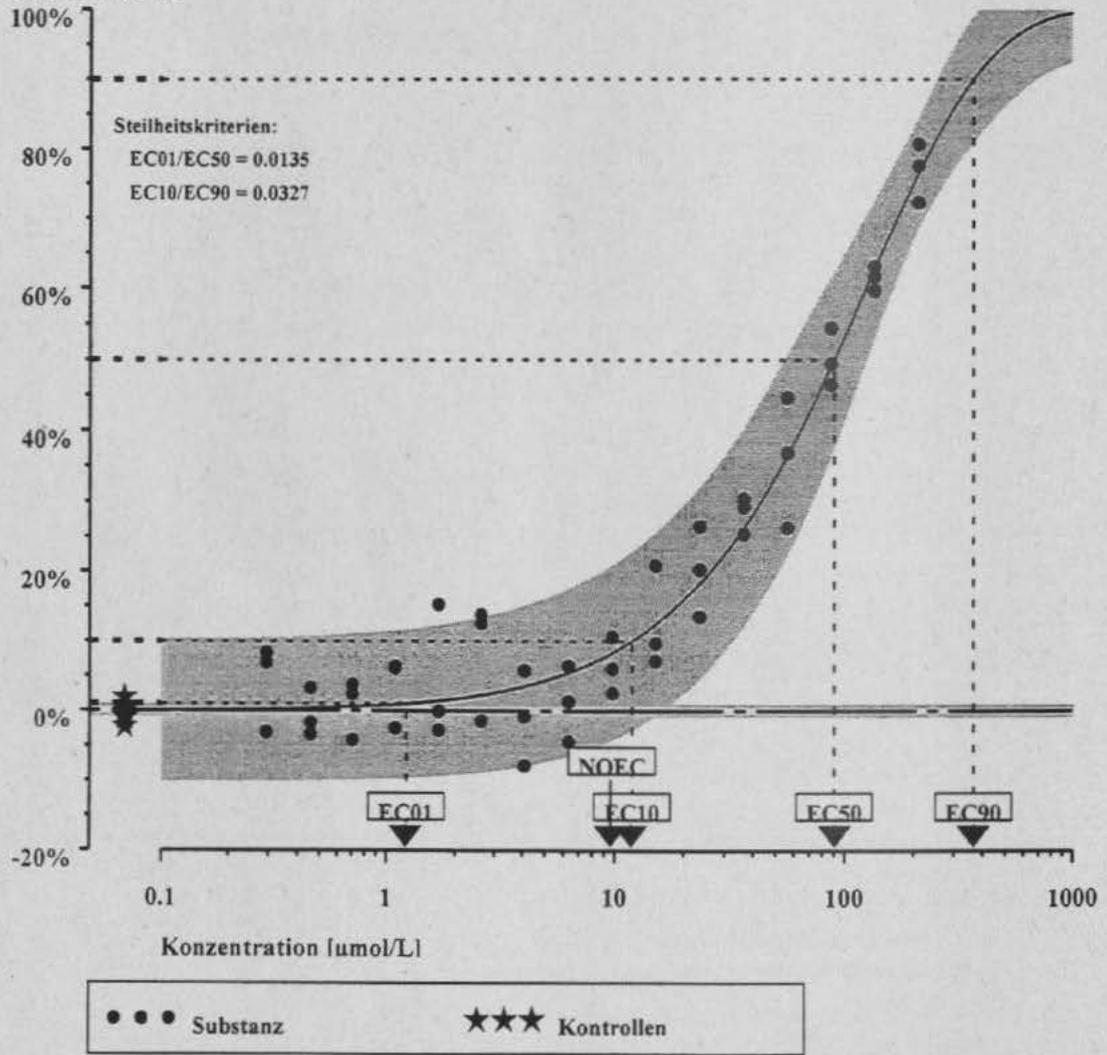
Box-Cox-Weibull: Wirkung = $1 - \exp(-\exp(-38.32 + 31.614 * (((\text{Konzentration}^{**} - 0.7383) - 1) / -0.7383)))$



EC-Werte [umol/L]: EC01 = 8.15354 [6.33871;9.68740]	EC-Werte [mg/L]: EC01 = 1.6099 [1.2516;1.9128]
EC10 = 12.2230 [11.2453;13.1596]	EC10 = 2.4134 [2.2204;2.5984]
EC50 = 19.0482 [18.6632;19.4580]	EC50 = 3.7611 [3.6851;3.8420]
EC90 = 27.9721 [27.4637;28.5382]	EC90 = 5.5231 [5.4227;5.6349]
NOEC = 9.5633 umol/L. LOEC = 12.868 umol/L	NOEC = 1.8883 mg/L. LOEC = 2.5408 mg/L

2,3,6-Trichlorphenol

48 Wirkdaten und 12 Kontrollen

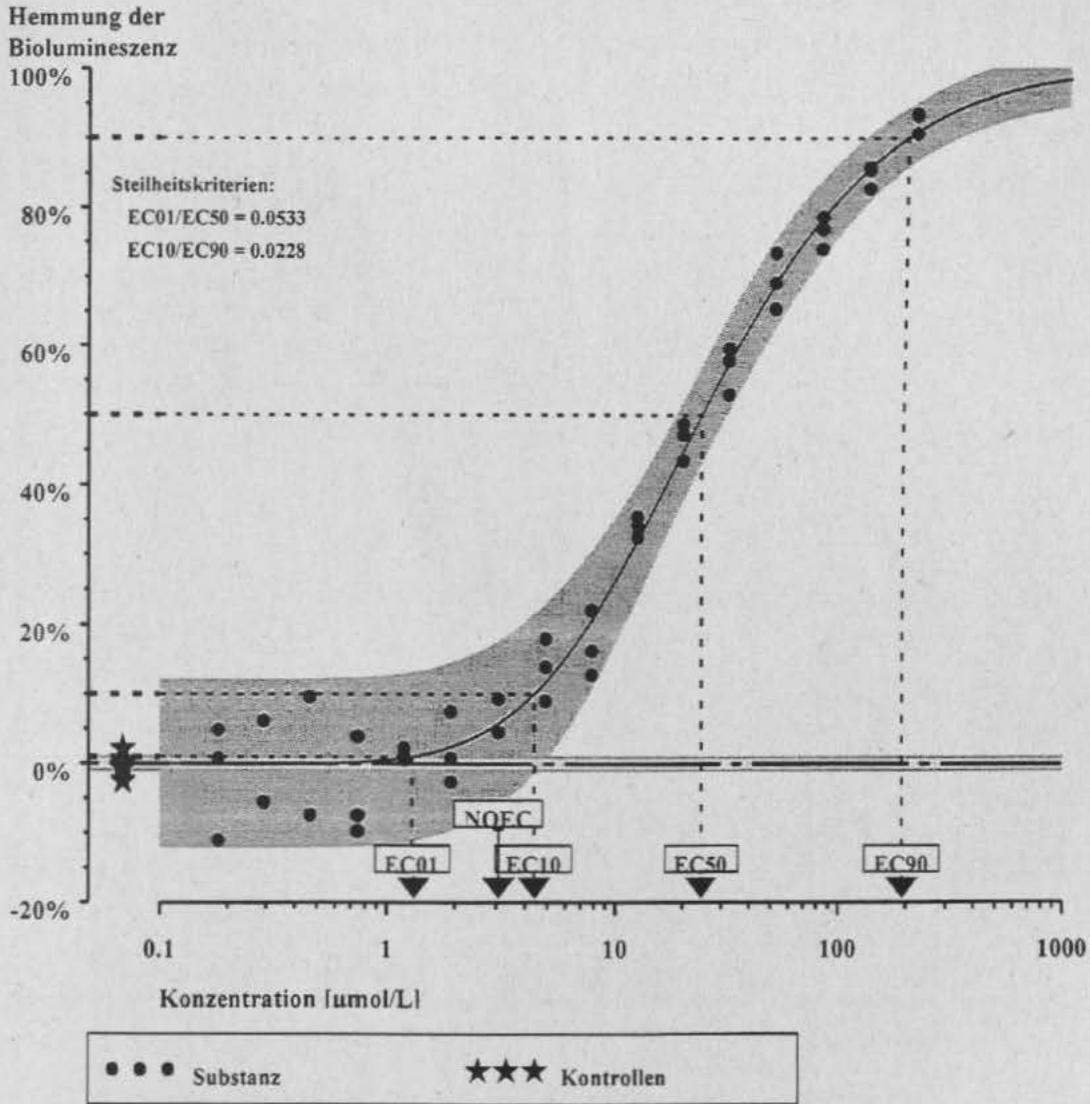
Box-Cox-Weibull: Wirkung = $1 - \exp(-\exp(-4.823 + 1.098 * (((Konzentration^{**} - 0.0471) - 1) / -0.0471)))$ Hemmung der
Biolumineszenz

EC-Werte (umol/L):	EC01 = 1.22645 (0.12423; 4.53156)	EC-Werte (mg/L):	EC01 = 0.24216 (0.02453; 0.89476)
	EC10 = 11.9865 (8.75471; 17.2442)		EC10 = 2.36673 (1.72862; 3.40486)
	EC50 = 90.5897 (78.8807; 104.301)		EC50 = 17.8869 (15.5750; 20.5942)
	EC90 = 366.345 (281.889; 614.005)		EC90 = 72.3349 (55.6589; 121.235)
NOEC = 9.8178 umol/L. LOEC = 15.218 umol/L		NOEC = 1.93852 mg/L. LOEC = 3.00479 mg/L	

2.4.6-Trichlorphenol

48 Wirkdaten und 12 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(-2.569+0.937*(((Konzentration**0.0979)-1)/-0.0979))



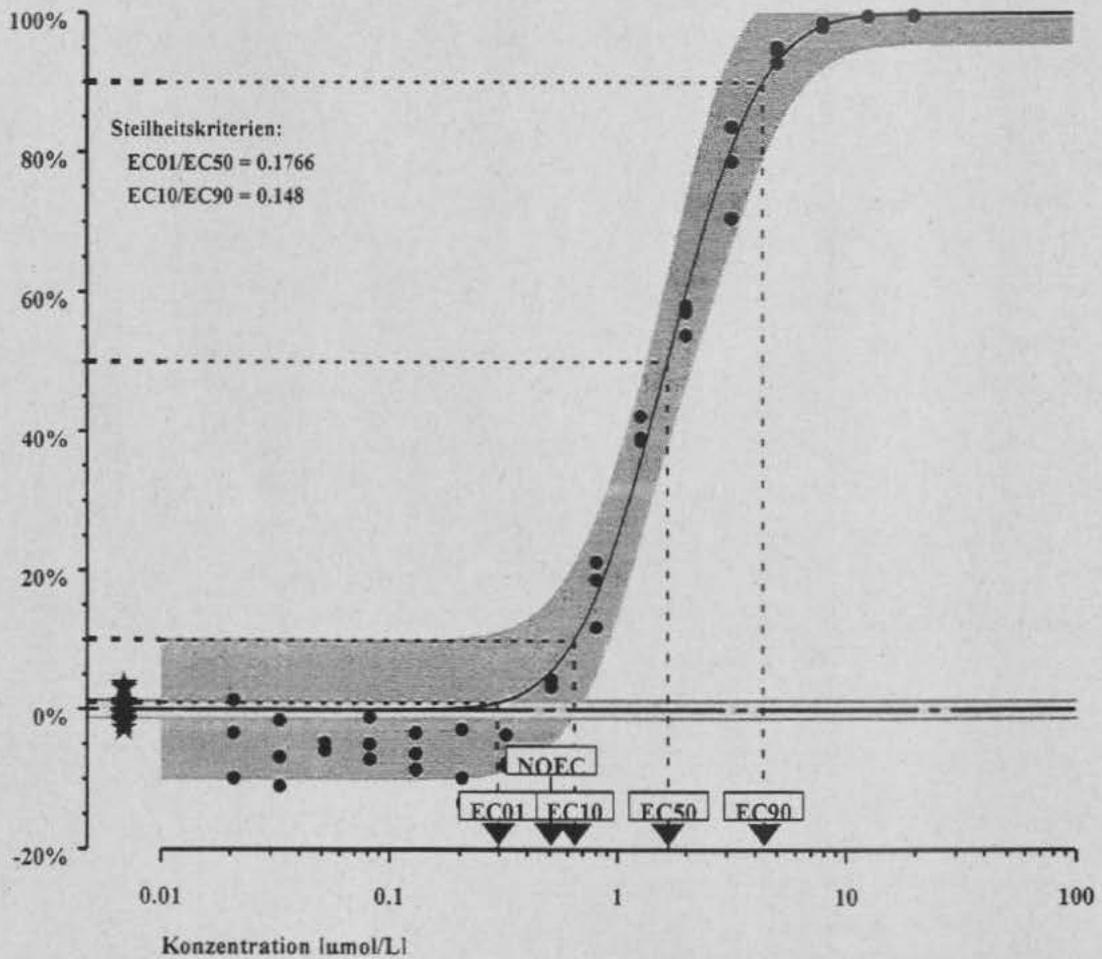
EC-Werte [umol/L]: EC01 = 1.30031 [0.59931;2.19704]	EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.25675 [0.11833;0.43380]
EC10 = 4.37683 [3.30154;5.50773]	EC10 = 0.86420 [0.65189;1.08750]
EC50 = 24.3784 [22.1345;26.7150]	EC50 = 4.81352 [4.37047;5.27487]
EC90 = 192.342 [161.111;241.722]	EC90 = 37.9779 [31.8114;47.7281]
NOEC = 3.0708 umol/L. LOEC = 4.9133 umol/L	NOEC = 0.60633 mg/L. LOEC = 0.97013 mg/L

D1.4 Bakterientoxizität der 14 Substanzen *unähnlicher* Wirkung

Actinomycin

48 Wirkdaten und 12 Kontrollen

Probit: Wirkung=Probnorm(-0.695+3.089*(log10(Konzentration)))

Hemmung der
Biolumineszenz

● ● ● Substanz

★ ★ ★ Kontrollen

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.29647 [0.22824;0.39094] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.37222 [0.28678;0.49122]

EC10 = 0.64595 [0.55137;0.76198]

EC10 = 0.81163 [0.69279;0.95743]

EC50 = 1.67902 [1.55198;1.82979]

EC50 = 2.10969 [1.95006;2.29913]

EC90 = 4.36429 [3.68060;5.14347]

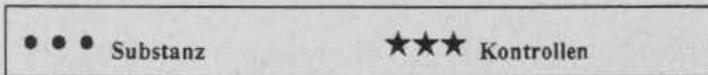
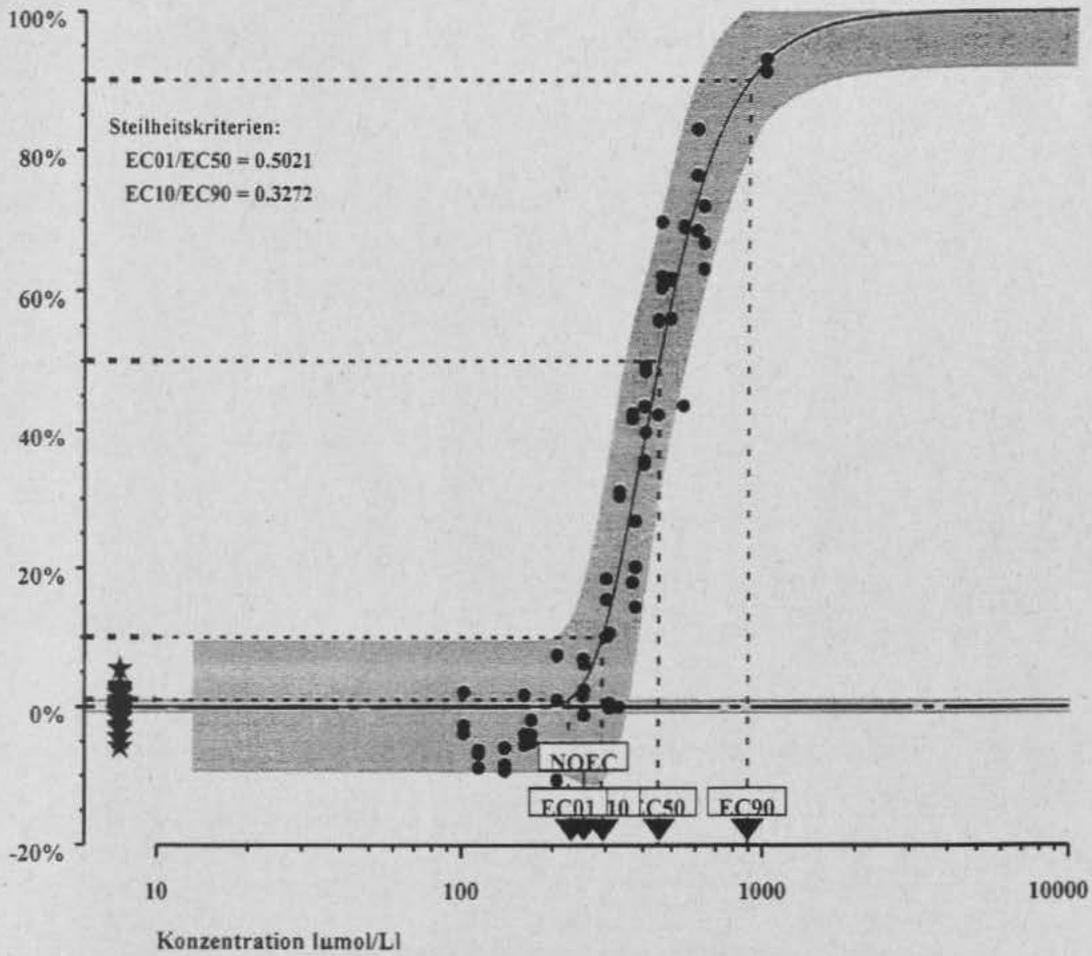
EC90 = 5.48373 [4.62467;6.46277]

NOEC = 0.5124 umol/l. LOEC = 0.8096 umol/L

NOEC = 0.6433 mg/L. LOEC = 1.0165 mg/L

Ampicillin

66 Wirkdaten und 34 Kontrollen

G.Logit: Wirkung= $1/(1+\exp(-(-11.46+6.370*(\log_{10}(\text{Konzentration}))))$)*160.880Hemmung der
BiolumineszenzEC-Werte $\mu\text{mol/L}$: EC01 = 225.915 [192.616:257.587] EC-Werte mg/L : EC01 = 83.9048 [71.5376:95.6678]

EC10 = 290.992 [267.602:315.967]

EC10 = 108.074 [99.3874:117.350]

EC50 = 449.910 [429.239:470.097]

EC50 = 167.097 [159.419:174.594]

EC90 = 889.475 [776.389:1059.28]

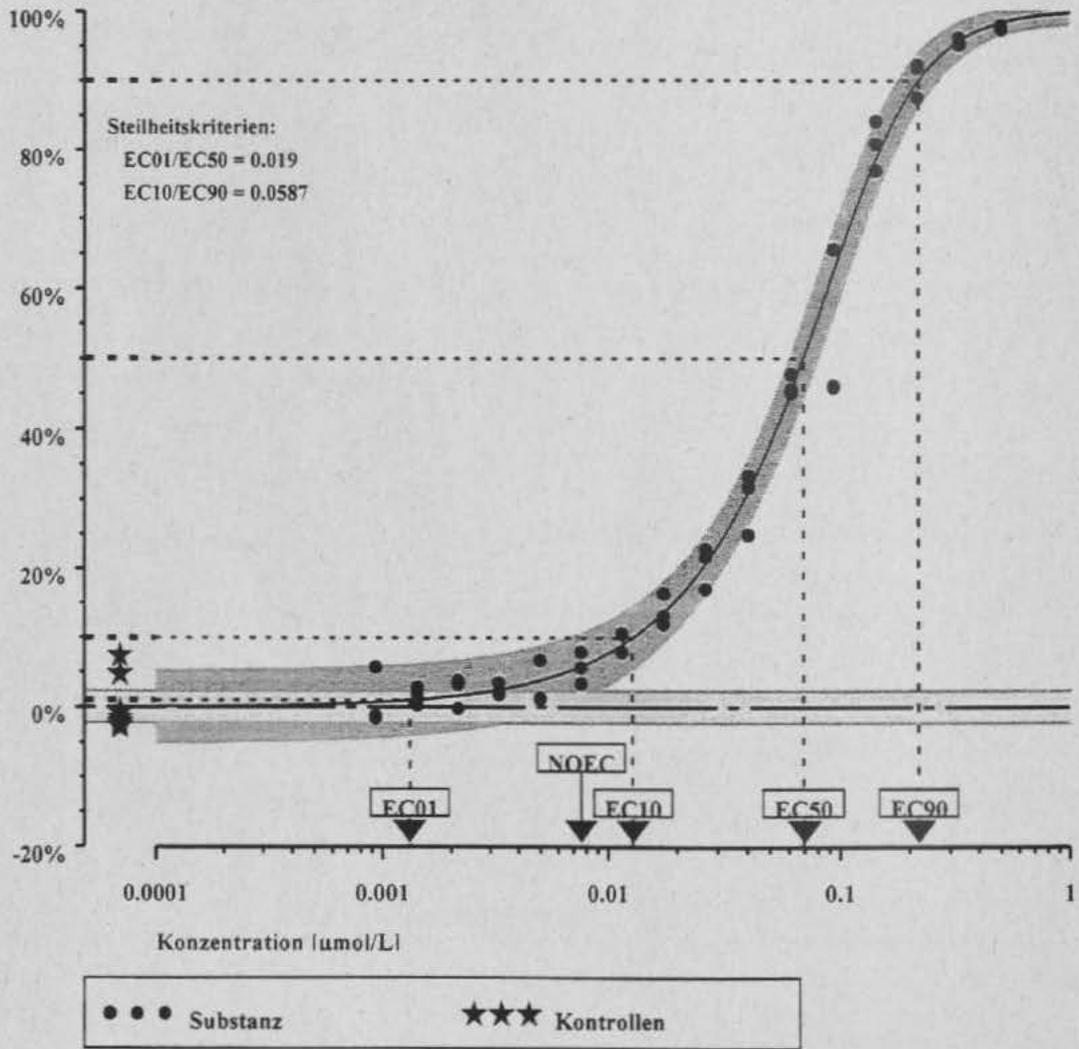
EC90 = 330.351 [288.351:393.416]

NOEC = 253.53 $\mu\text{mol/L}$, LOEC = 300.17 $\mu\text{mol/L}$ NOEC = 94.161 mg/L , LOEC = 111.48 mg/L

8-Azaguanin

48 Wirkdaten und 12 Kontrollen

G.Logit: Wirkung=1/(1+exp(-(4.810+5.324*(log10(Konzentration)))))*0.4377

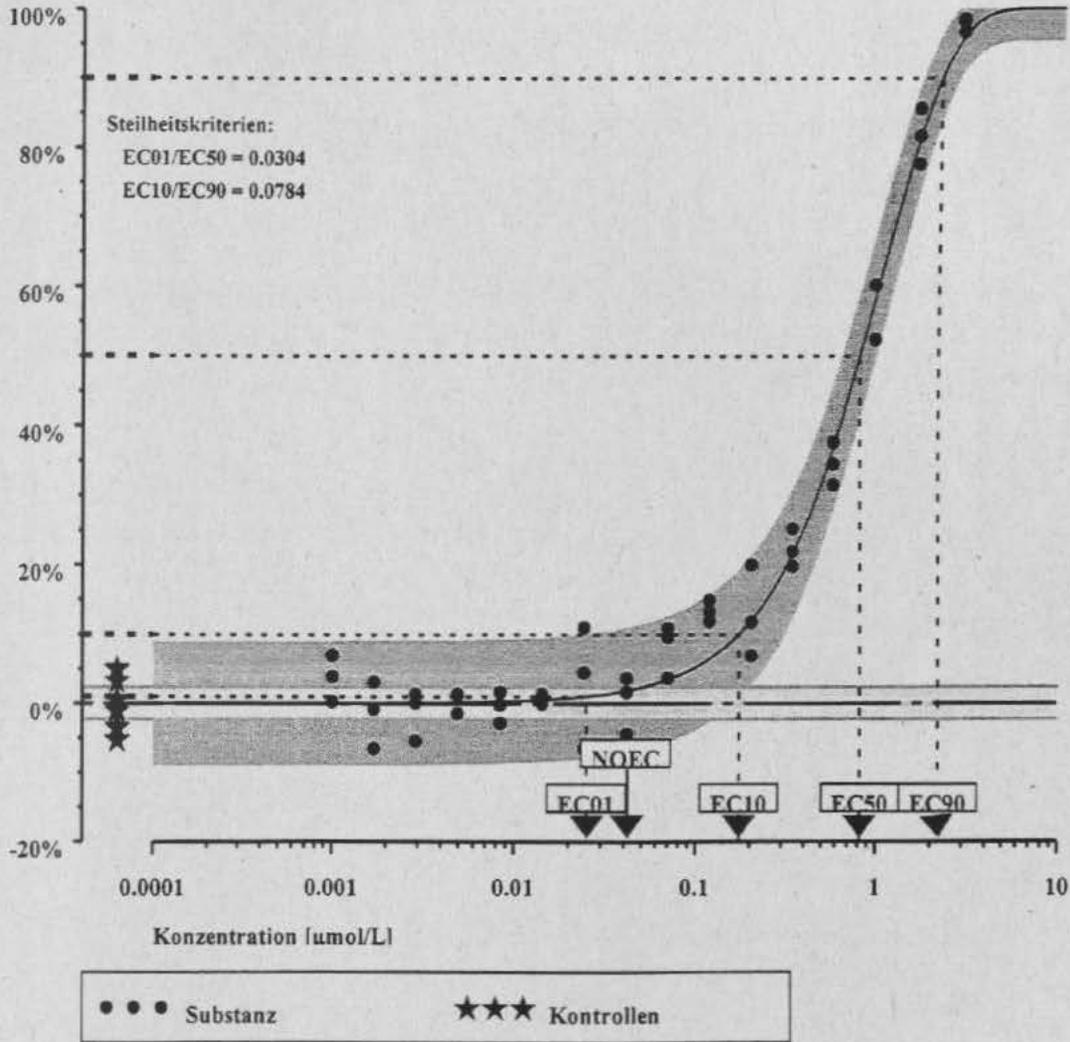
Hemmung der
Biolumineszenz

EC-Werte (µmol/L): EC01 = 0.00132 {0.00085:0.00198}	EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.00020 {0.00013:0.00030}
EC10 = 0.01287 {0.01111:0.01468}	EC10 = 0.00196 {0.00169:0.00223}
EC50 = 0.06954 {0.06580:0.07358}	EC50 = 0.01058 {0.01001:0.01119}
EC90 = 0.21925 {0.20332:0.23690}	EC90 = 0.03335 {0.03093:0.03604}
NOEC = 0.0076 µmol/L. LOEC = 0.0115 µmol/L	NOEC = 0.00116 mg/L. LOEC = 0.00175 mg/L

Azaserin

48 Wirkdaten und 12 Kontrollen

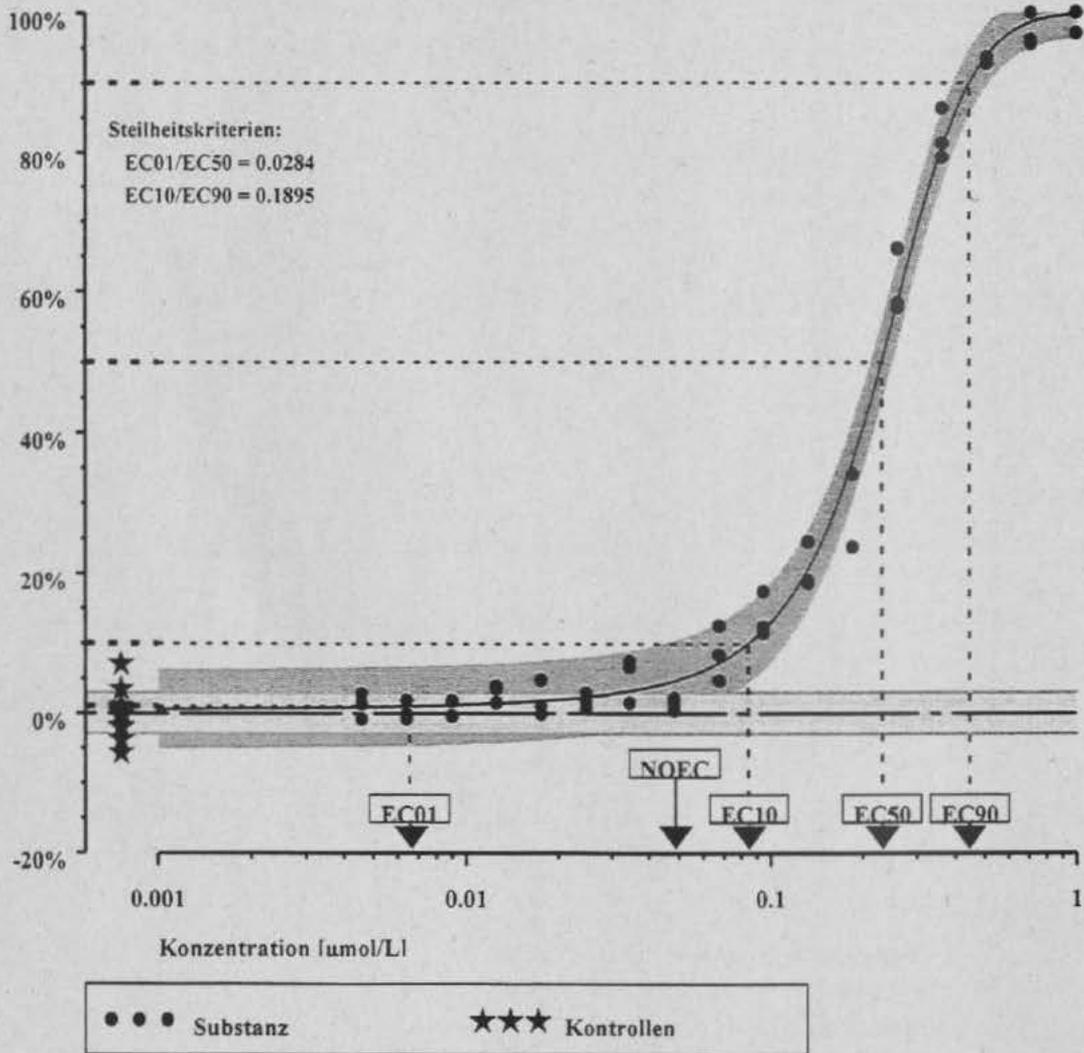
Weibull: Wirkung=1-exp(-exp(-0.134+2.790*log10(Konzentration)))

Hemmung der
Biolumineszenz

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.02506 [0.01664;0.03656] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00434 [0.00288;0.00633]
 EC10 = 0.17433 [0.14213;0.20953] EC10 = 0.03018 [0.02461;0.03628]
 EC50 = 0.82541 [0.76638;0.89032] EC50 = 0.14290 [0.13268;0.15414]
 EC90 = 2.22348 [1.99426;2.48057] EC90 = 0.38495 [0.34527;0.42946]
 NOEC = 0.0414 umol/l. LOEC = 0.0704 umol/L NOEC = 0.00717 mg/L. LOEC = 0.01219 mg/L

Chloramphenicol

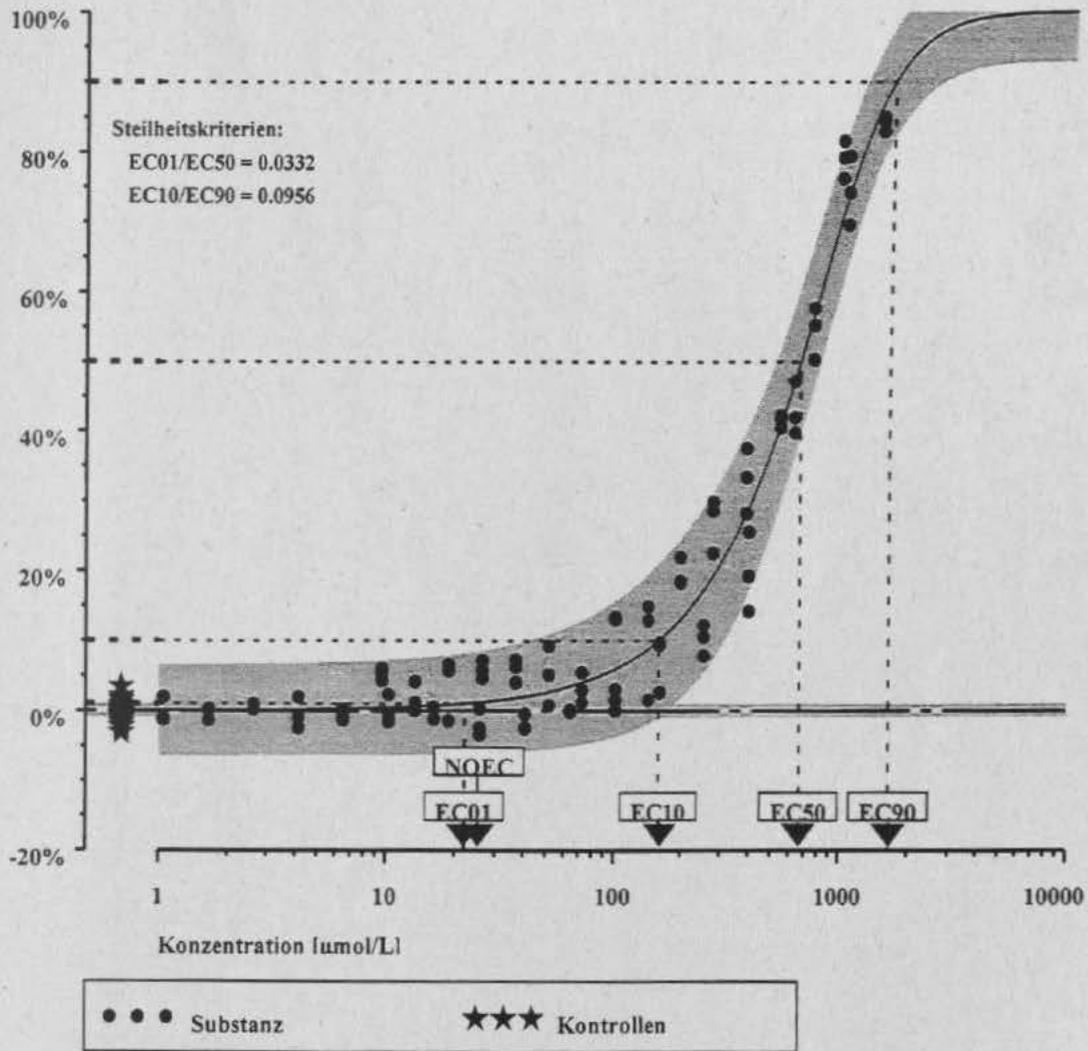
51 Wirksamkeiten und 9 Kontrollen

Box-Cox-Logit: Wirkung = $1/(1+\exp(-6.088+5.903*((\text{Konzentration}^{0.5099}-1)/0.5099)))$ Hemmung der
Biolumineszenz

EC-Werte (µmol/L): EC01 = 0.00656 [<0.0001 ;0.02051] EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.00212 [0.00000;0.00663]
 EC10 = 0.08485 [0.07681;0.09349] EC10 = 0.02742 [0.02482;0.03021]
 EC50 = 0.23136 [0.22353;0.23919] EC50 = 0.07476 [0.07223;0.07729]
 EC90 = 0.44782 [0.42411;0.47391] EC90 = 0.14471 [0.13704;0.15313]
 NOEC = 0.0484 µmol/L. LOEC = 0.0678 µmol/L NOEC = 0.01564 mg/L. LOEC = 0.02191 mg/L

Cycloserin

96 Wirkdaten und 24 Kontrollen

G.Logit: Wirkung= $1/(1+\exp(-(-21.45+7.015*(\log_{10}(\text{Konzentration})))))*0.3836$ Hemmung der
Biolumineszenz

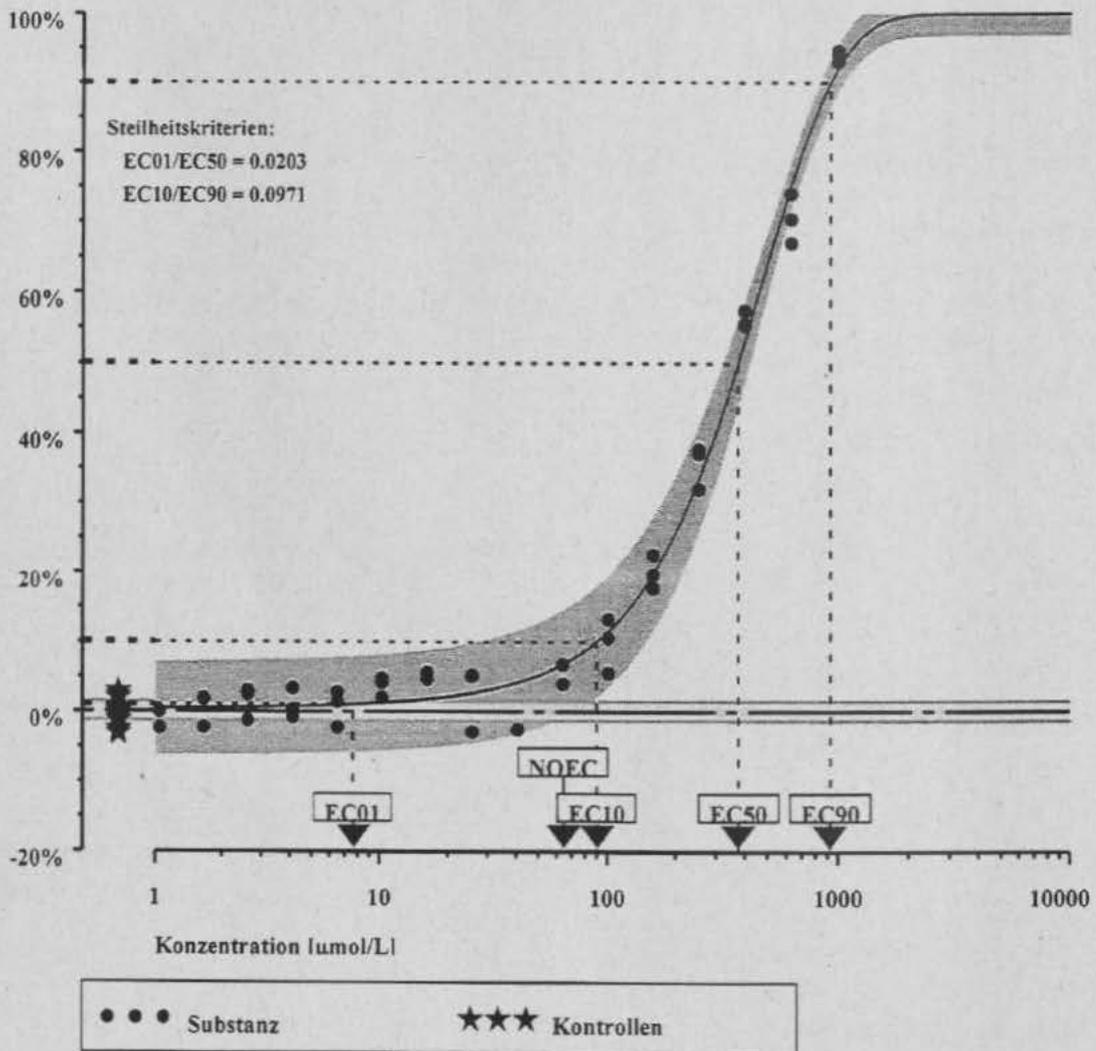
EC-Werte (umol/L): EC01 = 22.1689 [13.0067;37.1032] EC-Werte (mg/L): EC01 = 2.26322 [1.32786;3.78786]
 EC10 = 159.163 [132.849;187.588] EC10 = 16.2490 [13.5626;19.1508]
 EC50 = 668.633 [623.896;718.620] EC50 = 68.2607 [63.6935;73.3639]
 EC90 = 1664.95 [1432.91;2003.86] EC90 = 169.975 [146.285;204.574]

NOEC = 25.7480 umol/l. LOEC = 26.4579 umol/L NOEC = 2.62861 mg/L. LOEC = 2.70109 mg/L

Diltiazem

46 Wirkdaten und 12 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(-2.672+0.110*(((Konzentration**0.3994)-1)/0.3994))

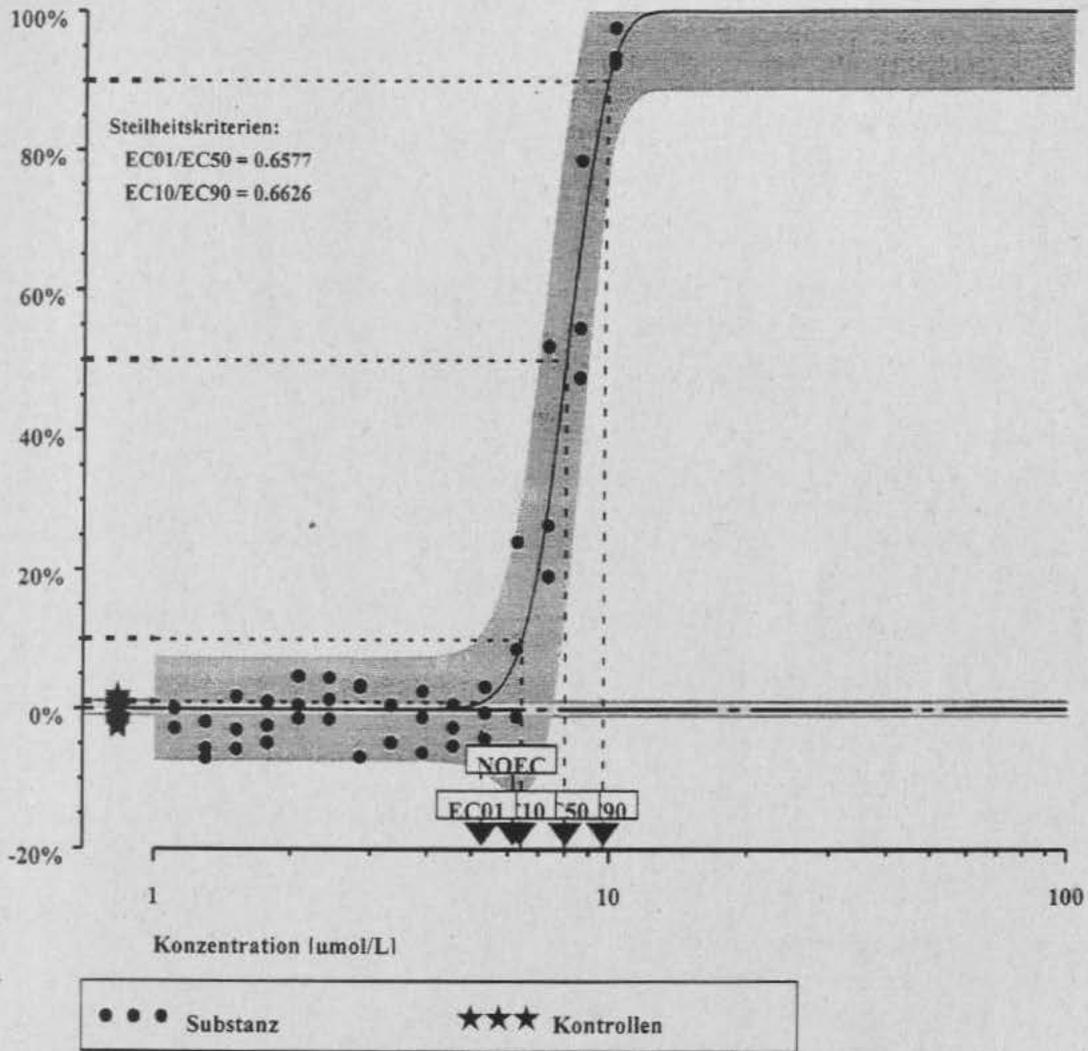
Hemmung der
Biolumineszenz

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 7.62913 [0.04817;22.6877]	EC-Werte [mg/L]: EC01 = 3.16250 [0.01997;9.40473]
EC10 = 90.1235 [75.6356;108.236]	EC10 = 37.3589 [31.3532;44.8670]
EC50 = 375.934 [357.285;396.406]	EC50 = 155.836 [148.105;164.322]
EC90 = 928.121 [871.750;987.018]	EC90 = 384.734 [361.366;409.148]
NOEC = 64.28 umol/l. LOEC = 101.56 umol/L	NOEC = 26.6460 mg/L. LOEC = 42.0997 mg/L

Dodecylpyridiniumbromid

43 Wirkdaten und 12 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(-7.539+1.865*(((Konzentration**0.5825)-1)/0.5825))

Hemmung der
Biolumineszenz

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 5.25205 [3.84309;6.86696] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 1.72446 [1.26211;2.25469]

EC10 = 6.42077 [5.87613;7.18929]

EC10 = 2.10819 [1.92936;2.36053]

EC50 = 7.98570 [7.48634;8.39943]

EC50 = 2.62202 [2.45806;2.75786]

EC90 = 9.69057 [8.72483;10.4753]

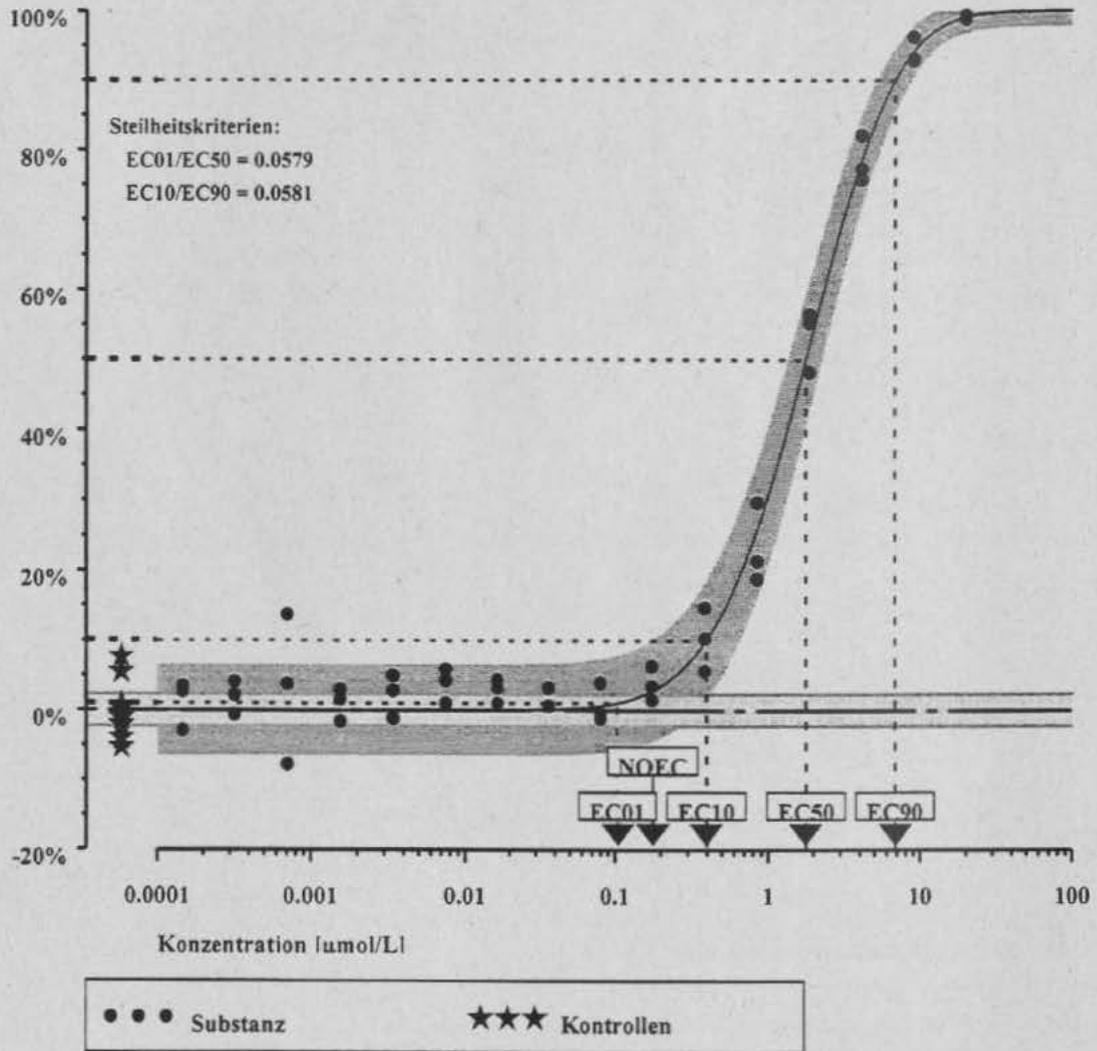
EC90 = 3.18180 [2.86471;3.43946]

NOEC = 6.2437 umol/l. LOEC = 7.3051 umol/L

NOEC = 2.0500 mg/L. LOEC = 2.4136 mg/L

Ethacrynsäure

48 Wirkdaten und 12 Kontrollen

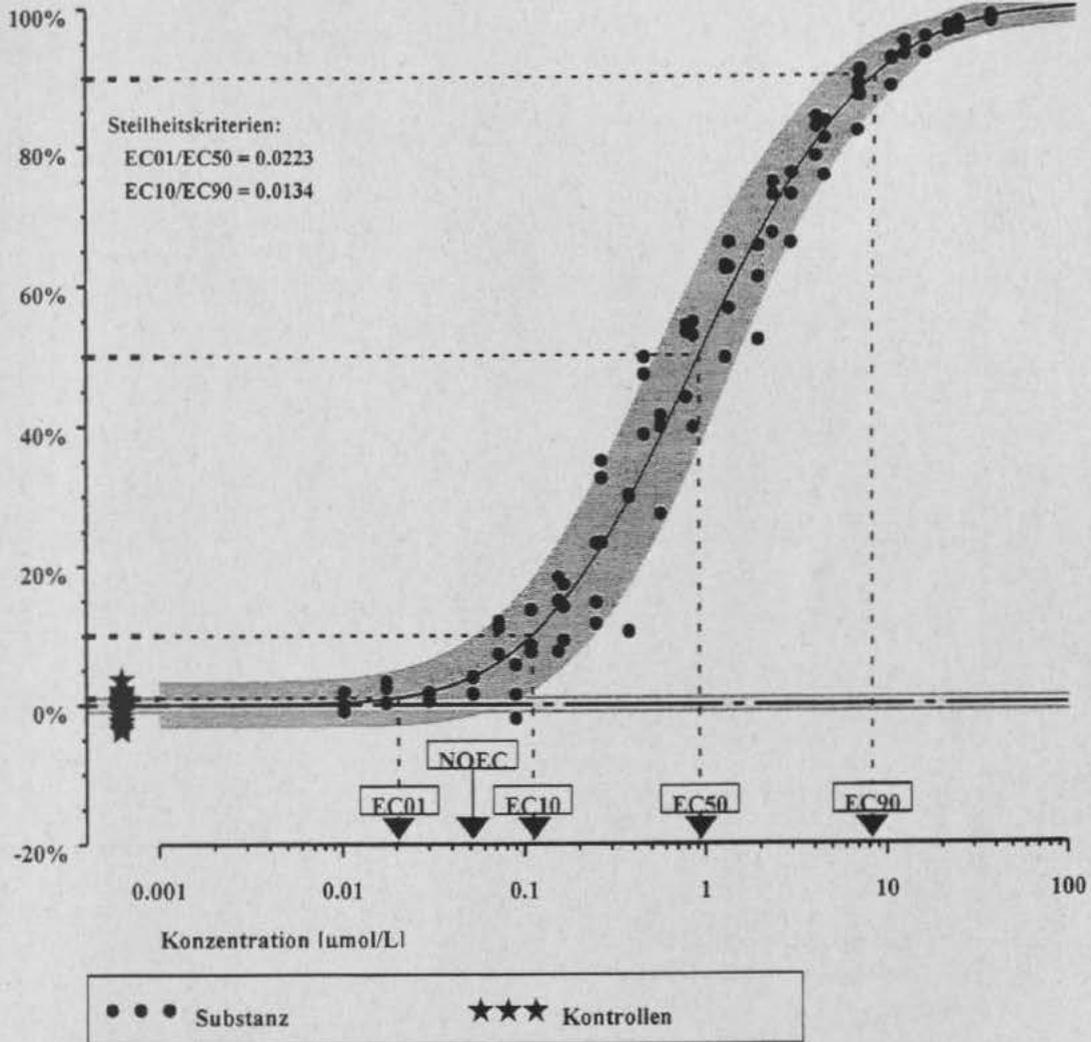
Box-Cox-Weibull: Wirkung= $1-\exp(-\exp(-1.016+1.196*\frac{((\text{Konzentration}^{**}-0.2350)-1)}{-0.2350})))$ Hemmung der
Biolumineszenz

EC-Werte (µmol/L): EC01 = 0.10348 (0.04548:0.19101)	EC-Werte (µg/L): EC01 = 0.03136 (0.01378:0.05789)
EC10 = 0.39698 (0.30010:0.51308)	EC10 = 0.12032 (0.09096:0.15551)
EC50 = 1.78789 (1.59998:1.98585)	EC50 = 0.54191 (0.48495:0.60191)
EC90 = 6.83690 (6.06939:7.76963)	EC90 = 2.07226 (1.83963:2.35497)
NOEC = 0.1764 µmol/L. LOEC = 0.3881 µmol/L	NOEC = 0.0534 µg/L. LOEC = 0.1176 µg/L

5-Fluoruracil

96 Wirksamkeiten und 18 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(0.048+0.593*(((Konzentration**-0.0150)-1)/-0.0150))

Hemmung der
Biolumineszenz

EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 0.02053 [0.01369;0.02947] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.00267 [0.00178;0.00383]

EC10 = 0.11041 [0.09372;0.13072]

EC10 = 0.01436 [0.01219;0.01700]

EC50 = 0.92263 [0.83805;1.01200]

EC50 = 0.12002 [0.10901;0.13164]

EC90 = 8.26741 [7.58784;8.97428]

EC90 = 1.07542 [0.98703;1.16737]

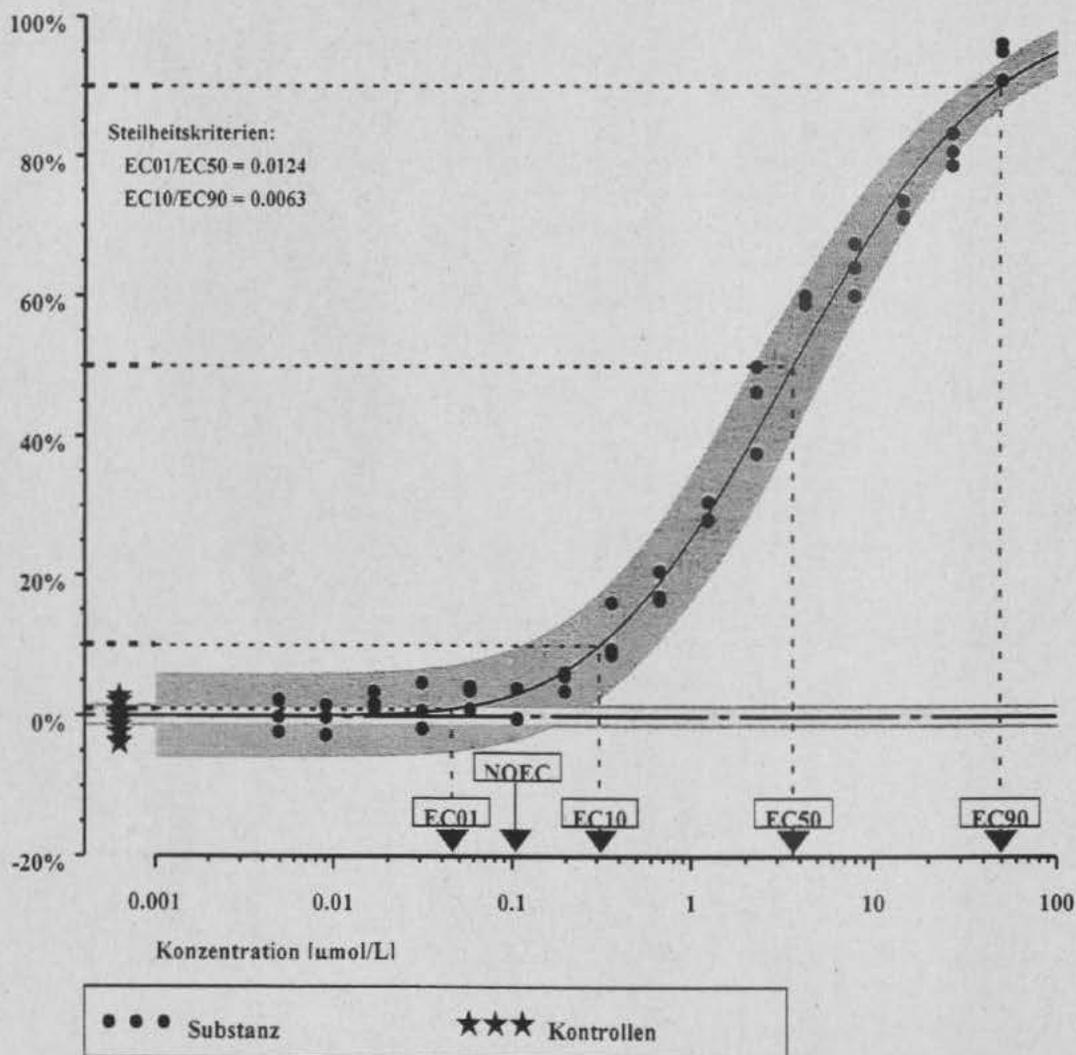
NOEC = 0.0519 µmol/L. LOEC = 0.0718 µmol/L

NOEC = 0.00675 mg/L. LOEC = 0.00934 mg/L

Fusidinsäure

48 Wirksamkeitsdaten und 12 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(-0.667+0.520*(((Konzentration**-0.0198)-1)/-0.0198))

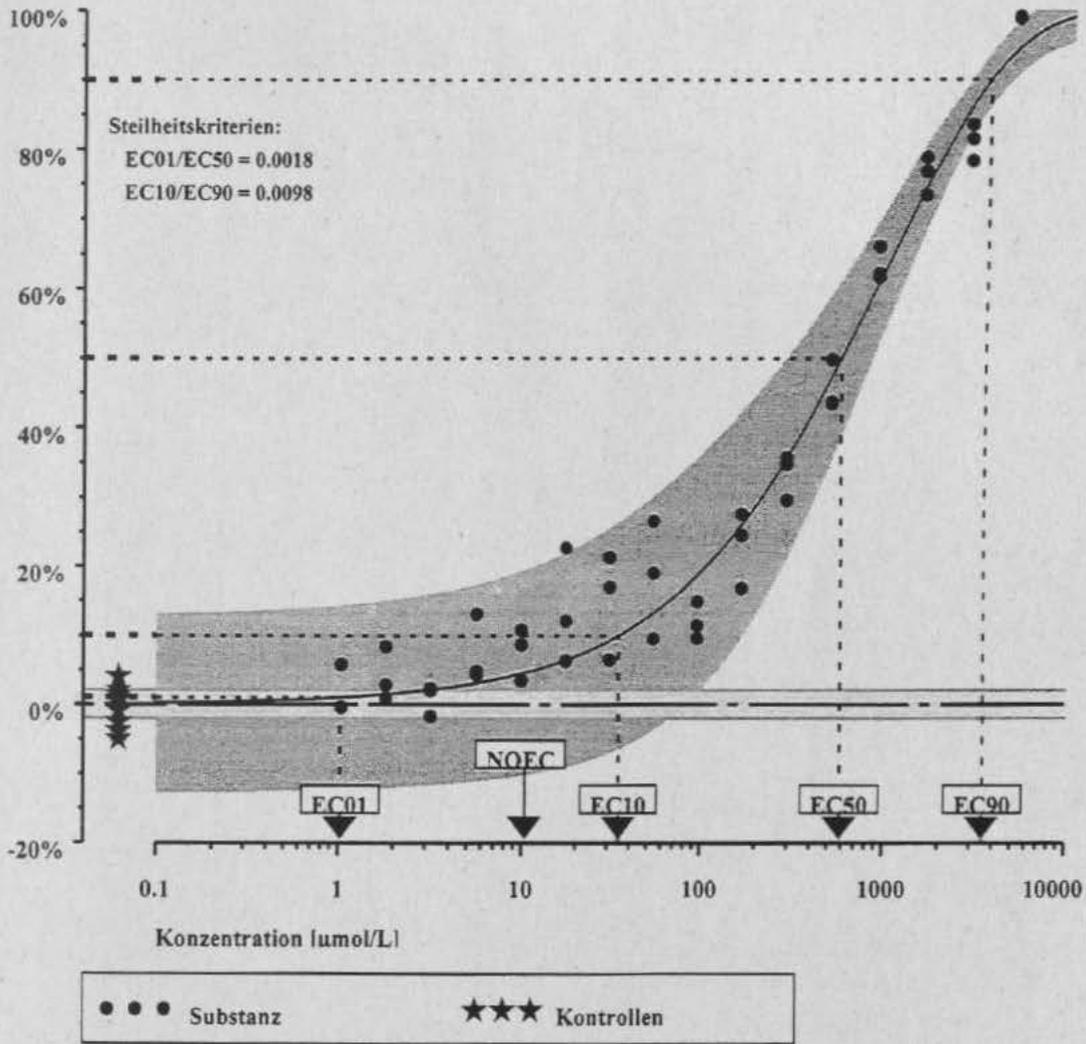
Hemmung der
Biolumineszenz

EC-Werte (μmol/L): EC01 = 0.04531 [0.01952:0.08797] EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.02440 [0.01051:0.047391]
 EC10 = 0.31085 [0.23799:0.40137] EC10 = 0.16745 [0.12820:0.21622]
 EC50 = 3.66404 [3.16449:4.22396] EC50 = 1.97382 [1.70741:2.27545]
 EC90 = 49.0153 [40.7361:61.4467] EC90 = 26.4045 [21.9445:33.1013]

NOEC = 0.1065 μmol/L. LOEC = 0.197 μmol/L NOEC = 0.0574 mg/L. LOEC = 0.1061 mg/L

Metalaxyl

48 Wirkdaten und 11 Kontrollen

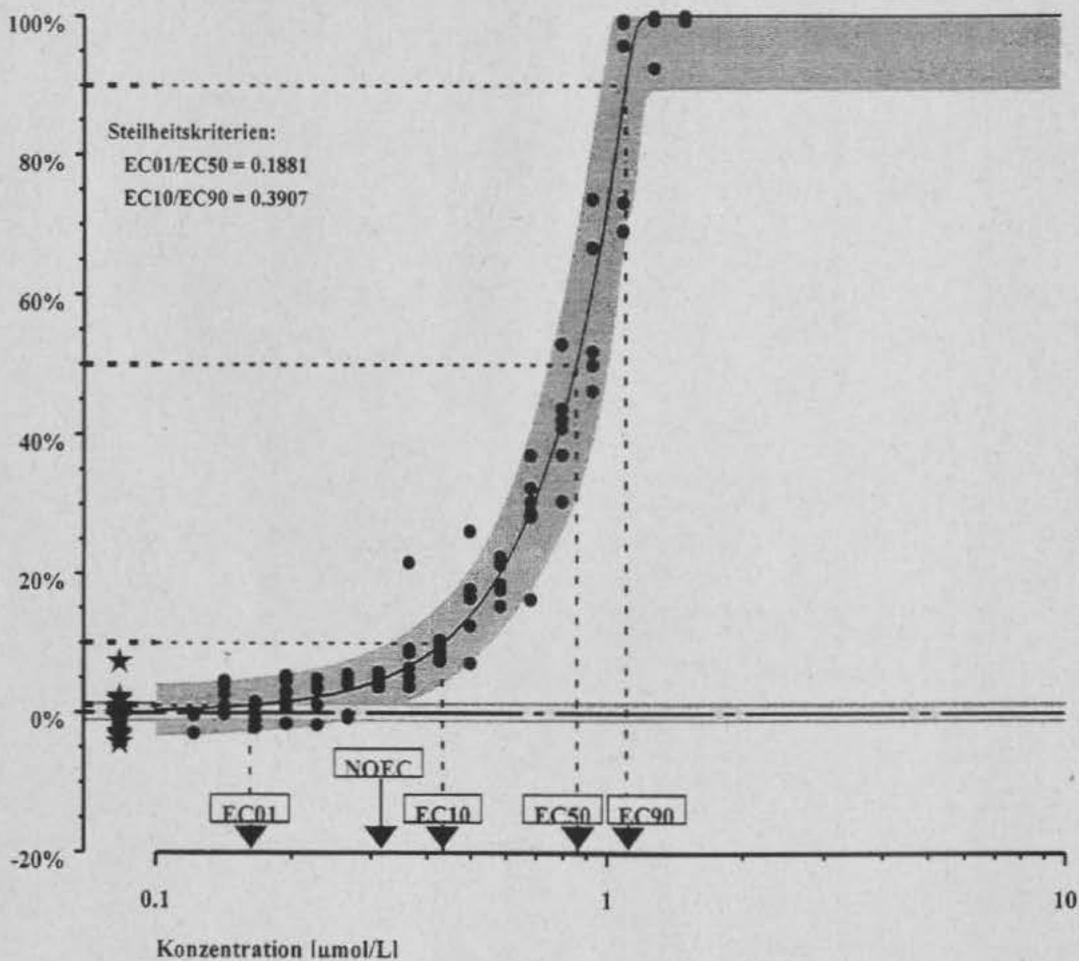
Weibull: $\text{Wirkung} = 1 - \exp(-\exp(-4.620 + 1.537 \cdot \log_{10}(\text{Konzentration})))$ Hemmung der
Biolumineszenz

EC-Werte (µmol/L): EC01 = 1.03051 (0.48040;2.13622) EC-Werte (mg/L): EC01 = 0.28782 (0.13418;0.59665)
 EC10 = 34.8236 (123.3045;51.9611) EC10 = 9.72623 (6.50895;14.51271)
 EC50 = 585.533 (508.799;669.896) EC50 = 163.539 (142.108;187.102)
 EC90 = 3537.15 (3162.74;3970.371) EC90 = 987.925 (883.353;1108.921)

NOEC = 9.9616 µmol/L, LOEC = 17.532 µmol/L NOEC = 2.78227 mg/L, LOEC = 4.89669 mg/L

Nalidixinsäure

96 Wirkdaten und 19 Kontrollen

G.Logit: Wirkung= $1/(1+\exp(-(-8.213+128.48*(\log_{10}(\text{Konzentration}))))))^{*0.0420}$ Hemmung der
Biolumineszenz

● ● ● Substanz ★ ★ ★ Kontrollen

EC-Werte [umol/L]: EC01 = 0.16211 | 0.14540:0.18072 | EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.03765 | 0.03377:0.04197 |

EC10 = 0.43337 | 0.41574:0.45415 |

EC10 = 0.10065 | 0.09655:0.10547 |

EC50 = 0.86172 | 0.83601:0.89199 |

EC50 = 0.20012 | 0.19415:0.20716 |

EC90 = 1.10928 | 1.06924:1.16702 |

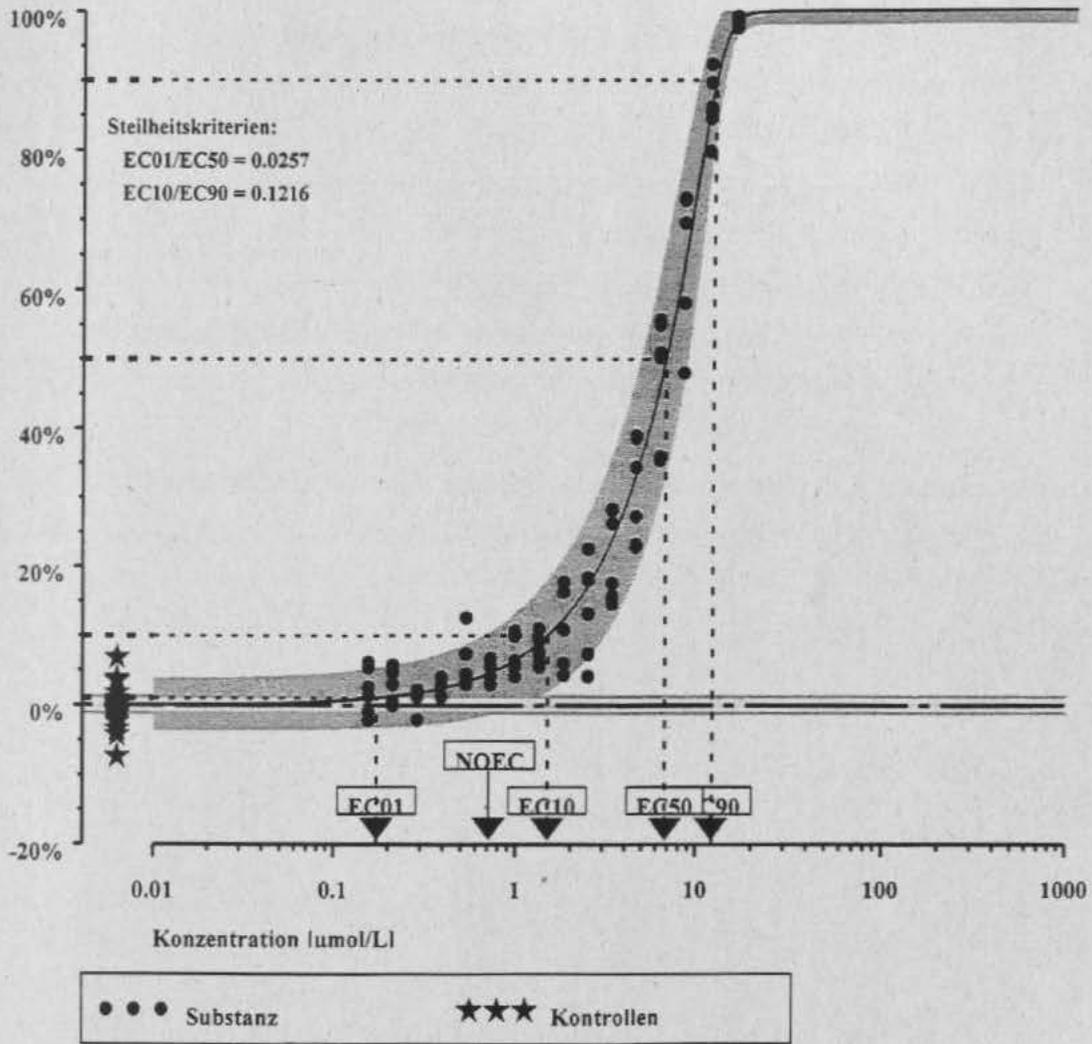
EC90 = 0.25762 | 0.24832:0.27103 |

NOEC = 0.3121 umol/l. LOEC = 0.3651 umol/L

NOEC = 0.07248 mg/L. LOEC = 0.08479 mg/L

Streptomycin

91 Wirkdaten und 24 Kontrollen

G.Logit: $Wirkung = 1 / (1 + \exp(-(-24.76 + 22.279 * (\log_{10}(\text{Konzentration})))))) * 0.1104$ Hemmung der
Biolumineszenz

EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 0.17344 [0.12679;0.23006] EC-Werte [mg/L]: EC01 = 0.25276 [0.18479;0.33528]

EC10 = 1.49711 [1.30827;1.68949]

EC10 = 2.18188 [1.90666;2.46224]

EC50 = 6.75550 [6.29692;7.13210]

EC50 = 9.84540 [9.17707;10.3942]

EC90 = 12.3130 [11.6337;12.9053]

EC90 = 17.9449 [16.9549;18.8080]

NOEC = 0.7253 µmol/L. LOEC = 0.9864 µmol/L

NOEC = 1.05704 mg/L. LOEC = 1.43757 mg/L

Anhang D2: Konzentrations-Wirkungsdaten der Gemische

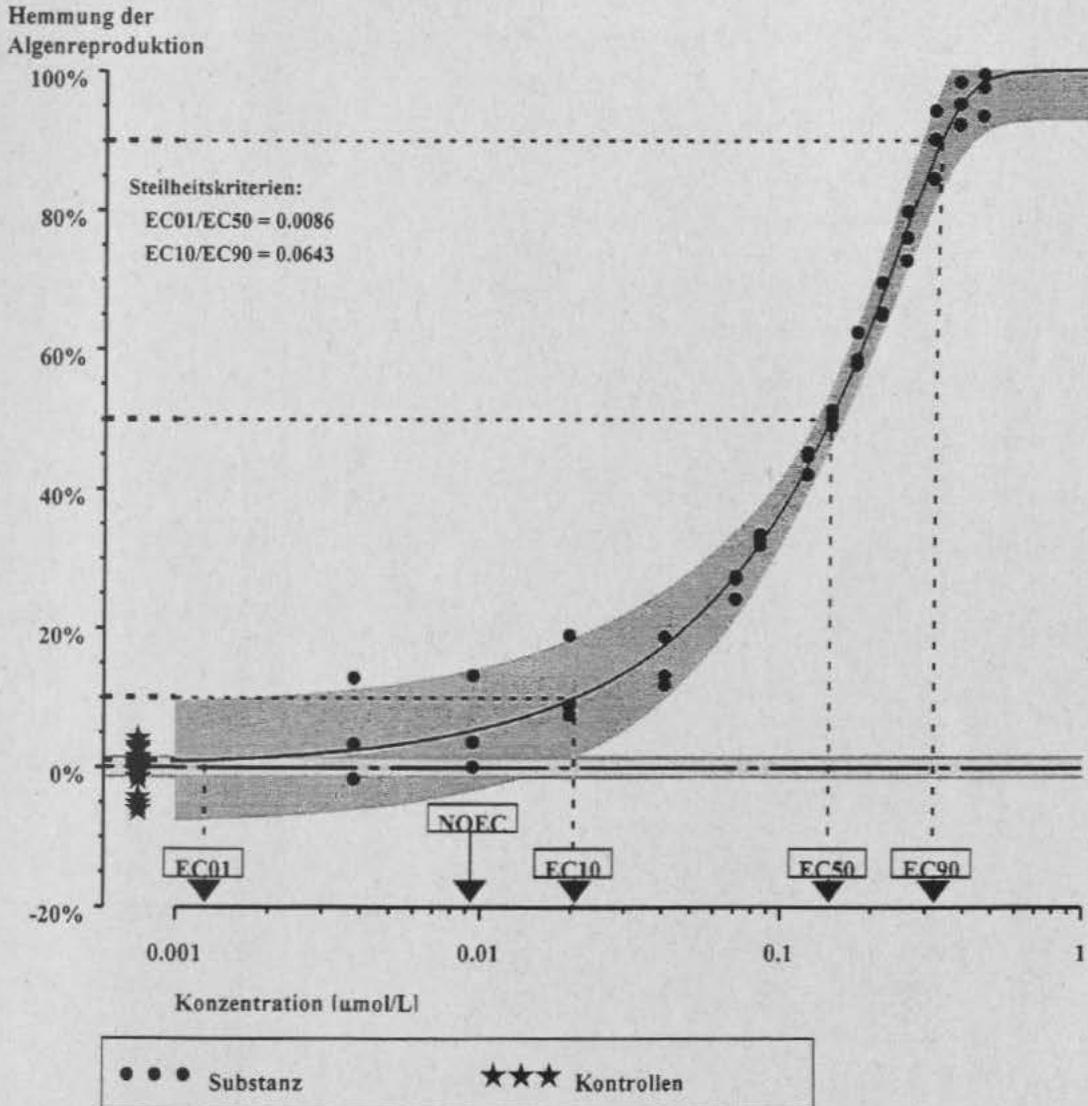
	Seite
D2.1 Toxizität der Gemische <i>ähnlicher</i> Wirkung im Algentest	
Mischungsverhältnis: EC ₅₀ der Komponenten.....	303
Mischungsverhältnis: EC ₀₁ der Komponenten.....	304
D2.2 Toxizität der Gemische <i>unähnlicher</i> Wirkung im Algentest	
Mischungsverhältnis: EC ₅₀ der Komponenten.....	305
Mischungsverhältnis: EC ₀₁ der Komponenten.....	306
D2.3 Toxizität der Gemische <i>ähnlicher</i> Wirkung im Leuchtbakterientest	
Mischungsverhältnis: EC ₅₀ der Komponenten.....	307
Mischungsverhältnis: EC ₀₁ der Komponenten.....	308
D2.4 Toxizität der Gemische <i>unähnlicher</i> Wirkung im Leuchtbakterientest	
Mischungsverhältnis: EC ₅₀ der Komponenten.....	309
Mischungsverhältnis: EC ₀₁ der Komponenten.....	310

Mischungstoxizität von 18 ähnlich wirkenden Stoffen (s-Triazine)

Mischungsverhältnis: EC₅₀ der Komponenten

42 Wirkdaten und 18 Kontrollen

G.Logit: Wirkung=1/(1+exp(-(-7.714+16.267*(log10(Konzentration)))))*0.1164



EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 0.00124 [0.00071;0.00194]

EC10 = 0.02042 [0.01602;0.02444]

EC50 = 0.14454 [0.13825;0.14877]

EC90 = 0.31771 [0.30174;0.34569]

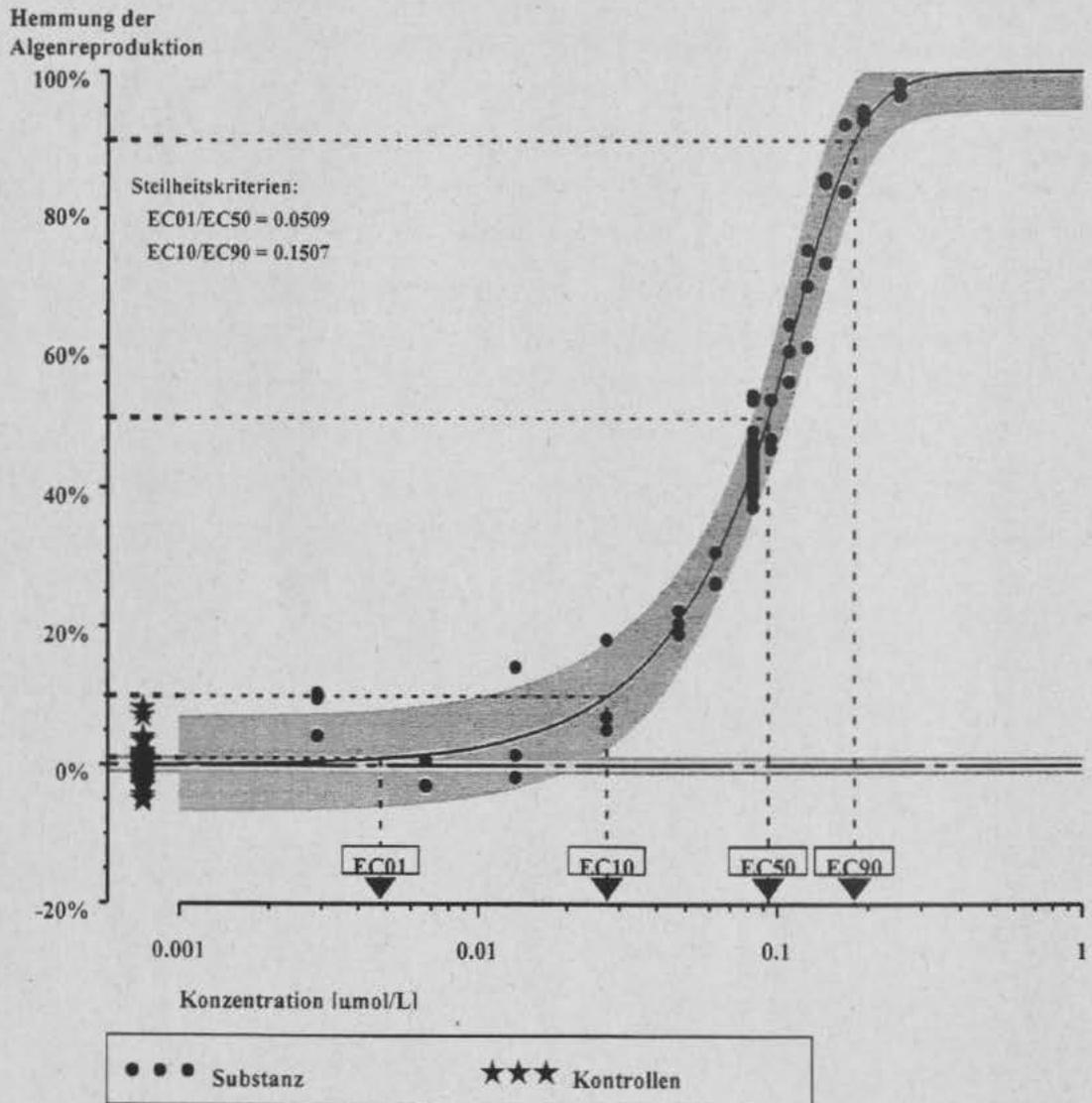
NOEC = 0.0095 µmol/L. LOEC = 0.0196 µmol/L

Mischungstoxizität von 18 ähnlich wirkenden Stoffen (s-Triazine)

Mischungsverhältnis: EC₀₁ der Komponenten

72 Wirkdaten und 33 Kontrollen

G.Logit: Wirkung = $1/(1+\exp(-9.155+11.340*(\log_{10}(\text{Konzentration}))))**0.2681$



EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 0.00476 (0.00198:0.00717)

EC10 = 0.02725 (0.01944:0.03157)

EC50 = 0.09367 (0.09189:0.09724)

EC90 = 0.18077 (0.16836:0.19513)

NOEC = nicht bestimmbar . LOEC = 0.0029 µmol/L

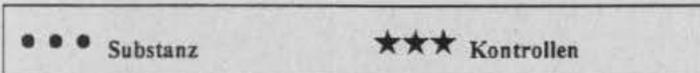
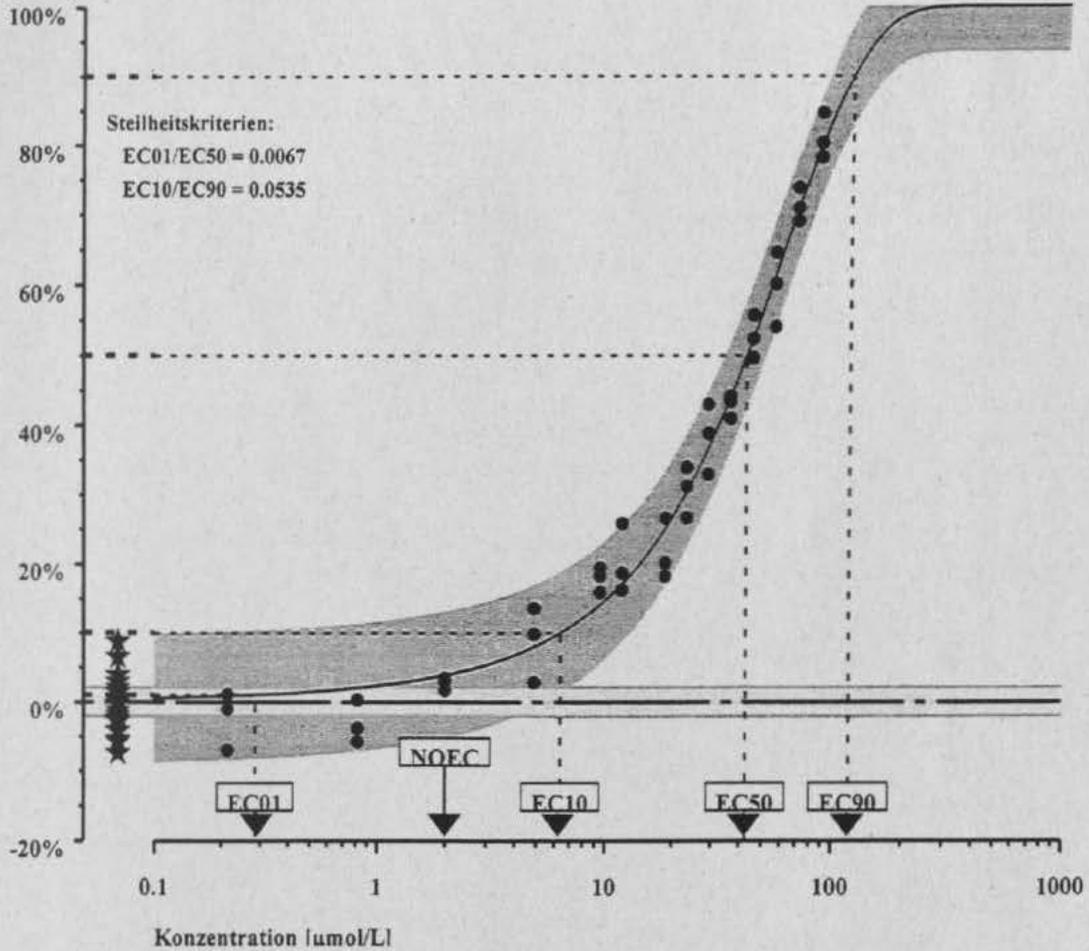
Mischungstoxizität von 16 unähnlich wirkenden Stoffen

Mischungsverhältnis: EC₅₀ der Komponenten

42 Wirkdaten und 18 Kontrollen

Box-Cox-Weibull: Wirkung = $1 - \exp(-\exp(-3.746 + 0.728 * (((\text{Konzentration}^{**0.1101}) - 1) / 0.1101)))$

Hemmung der
Algenreproduktion



EC-Werte (µmol/L): EC01 = 0.28475 [< 0.001 ; 1.23297]

EC10 = 6.37713 [4.50033; 8.24512]

EC50 = 42.5368 [40.2184; 45.2797]

EC90 = 119.215 [105.092; 144.749]

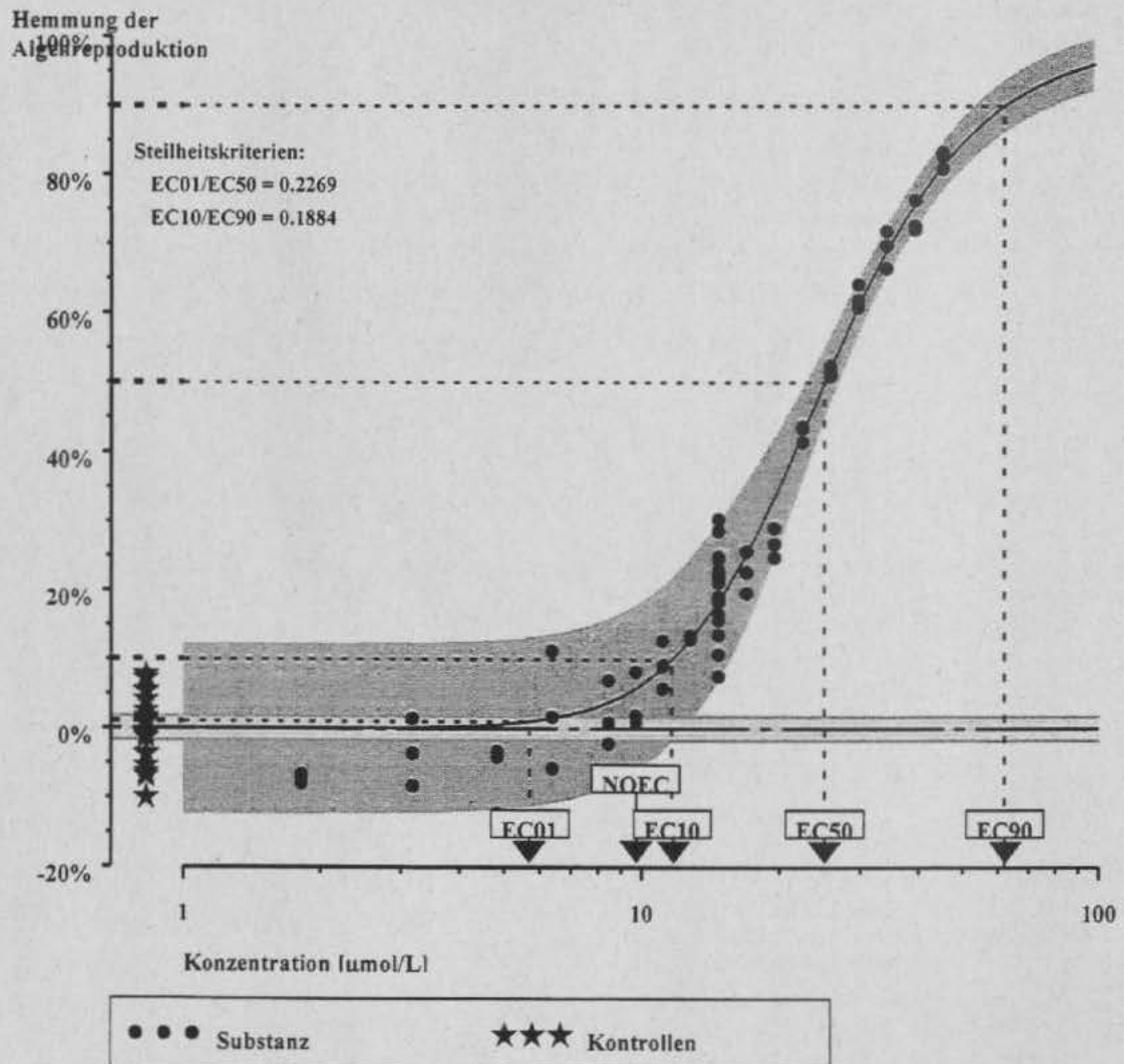
NOEC = 1.9949 µmol/L. LOEC = 4.8704 µmol/L

Mischungstoxizität von 16 unähnlich wirkenden Stoffen

Mischungsverhältnis: EC₀₁ der Komponenten

69 Wirkdaten und 36 Kontrollen

Box-Cox-Logit: Wirkung = $1/(1+\exp(-(-12.08+5.094*((\text{Konzentration}^{**}-0.2018)-1)/-0.2018)))$



EC-Werte [μmol/L]: EC01 = 5.70487 14.16489:7.227921

EC10 = 11.7031 110.8018:12.63411

EC50 = 25.1393 124.4510:25.80621

EC90 = 62.1080 156.3076:72.22951

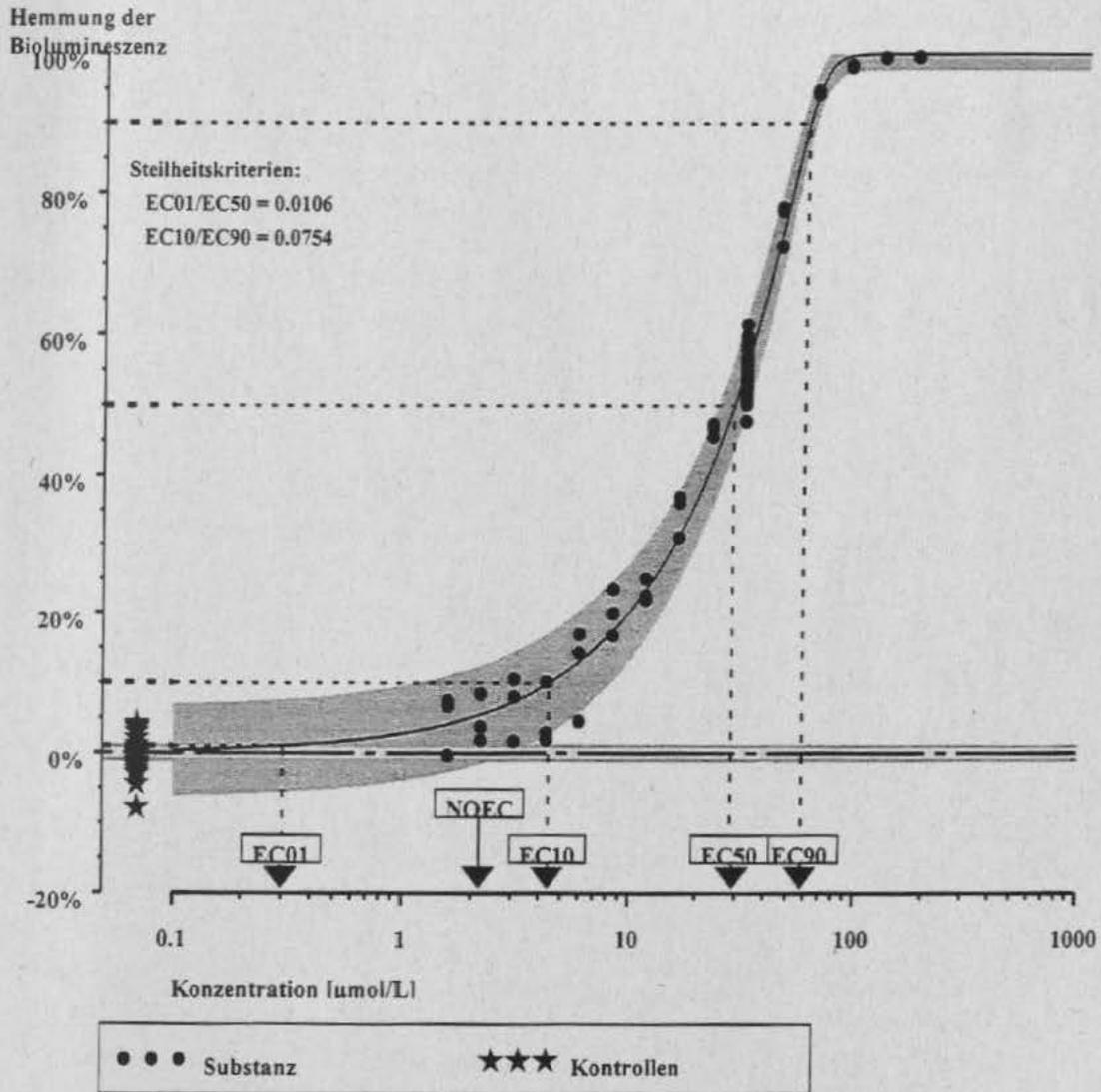
NOEC = 9.7325 μmol/L. LOEC = 11.192 μmol/L

Mischungstoxizität von 16 ähnlich wirkenden Stoffen (Entkoppler)

Mischungsverhältnis: EC₅₀ der Komponenten

90 Wirkdaten und 30 Kontrollen

G.Logit: Wirkung=1/(1+exp(-(-42.82+23.732*(log10(Konzentration)))))*0.0835



EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 0.30256 10.20756:0.442221

EC10 = 4.39206 13.73756:5.155151

EC50 = 28.4959 127.8782:29.09491

EC90 = 58.2628 156.1400:60.17341

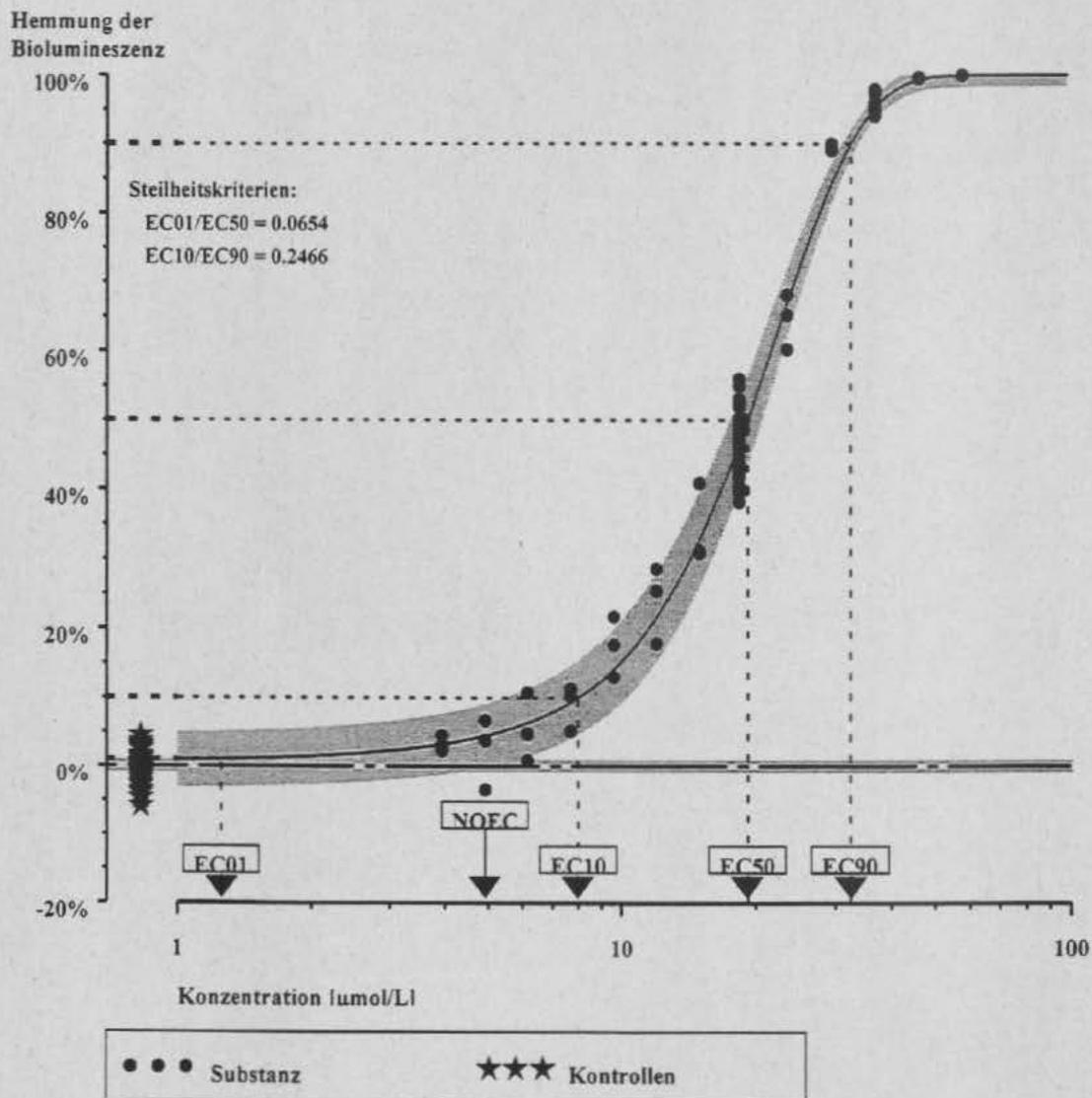
NOEC = 2.1859 µmol/L. LOEC = 3.0602 µmol/L

Mischungstoxizität von 16 ähnlich wirkenden Stoffen (Entkoppler)

Mischungsverhältnis: EC₀₁ der Komponenten

126 Wirkdaten und 45 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung = $\text{Probit}(-2.381 + 0.221 * (((\text{Konzentration}^{**0.7445}) - 1) / 0.7445))$



EC-Werte (μmol/L): EC01 = 1.25403 [<0.0001 ; 2.44995]

EC10 = 7.99596 [7.30664; 8.57536]

EC50 = 19.1738 [18.9333; 19.4112]

EC90 = 32.4209 [32.1572; 32.6561]

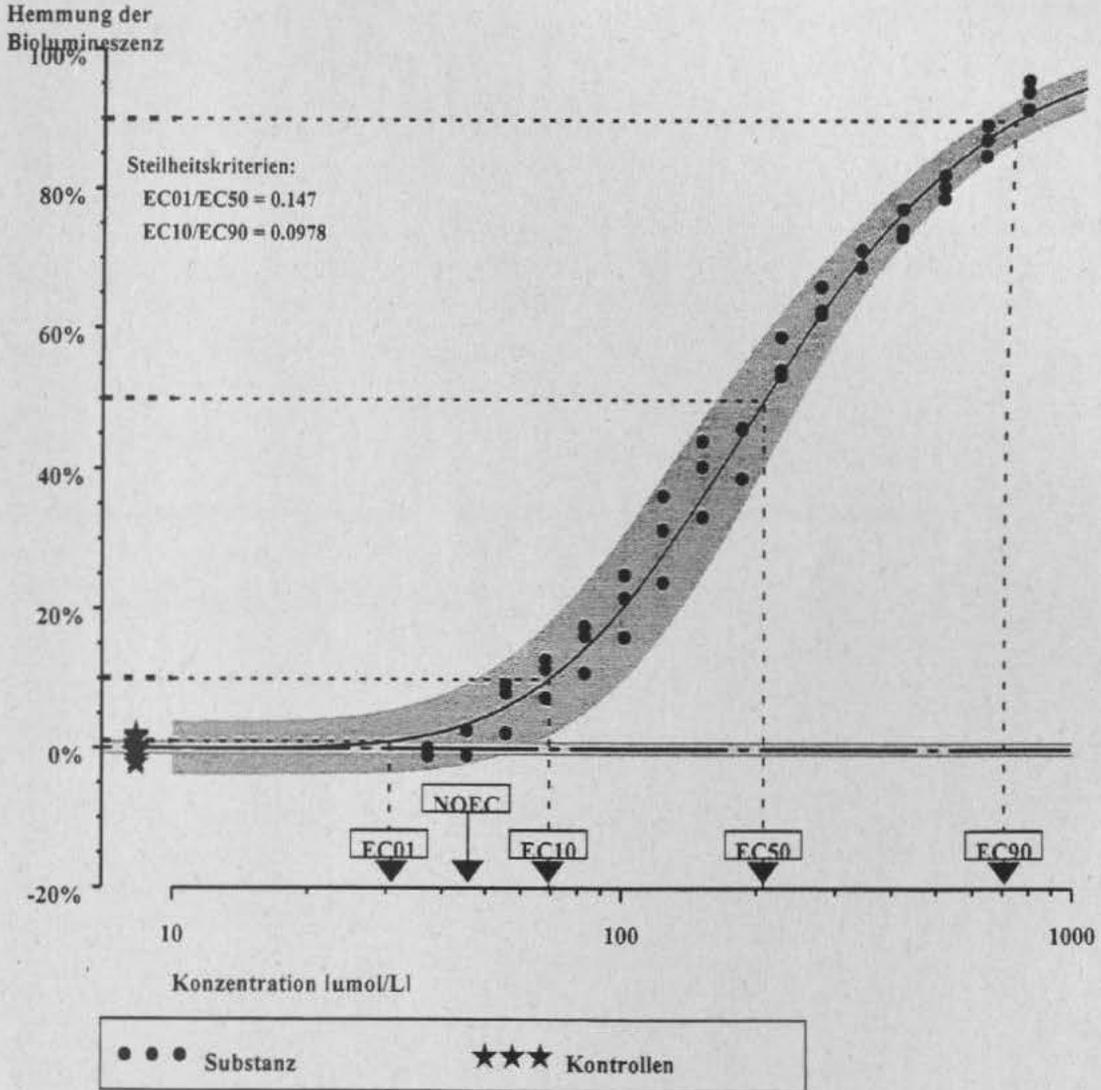
NOEC = 4.9278 μmol/L. LOEC = 6.1597 μmol/L

Mischungstoxizität von 14 unähnlich wirkenden Stoffen

Mischungsverhältnis: EC₅₀ der Komponenten

48 Wirkdaten und 12 Kontrollen

Box-Cox-Probit: Wirkung=Probit(-7.678+1.832*(((Konzentration**0.0944)-1)/-0.0944))



EC-Werte ($\mu\text{mol/L}$): EC01 = 30.5250 [23.3295;38.6072]

EC10 = 69.2013 [62.7699;76.2256]

EC50 = 207.643 [196.668;219.148]

EC90 = 707.619 [662.755;765.915]

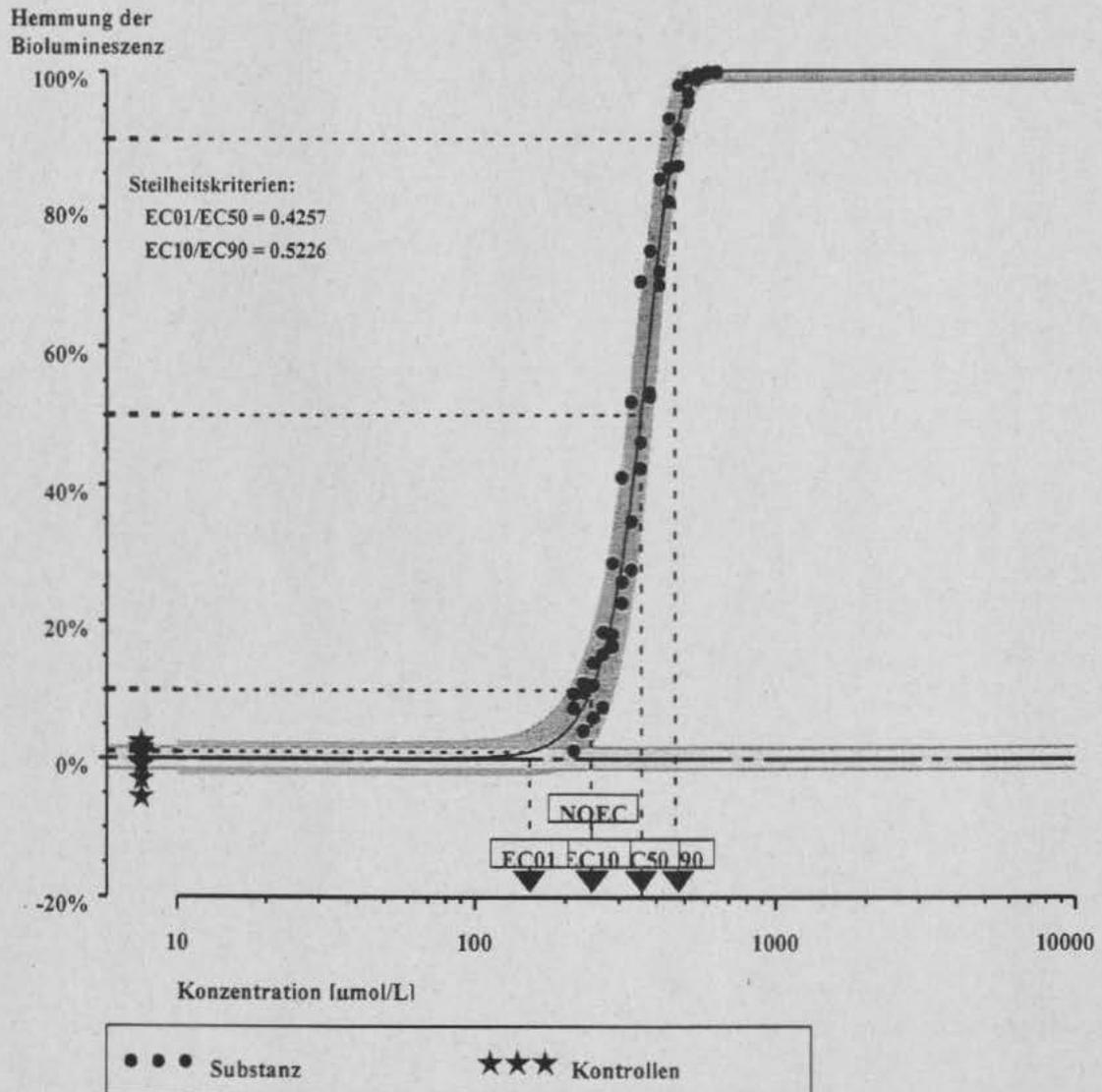
NOEC = 45.395 $\mu\text{mol/L}$. LOEC = 55.473 $\mu\text{mol/L}$

Mischungstoxizität von 14 unähnlich wirkenden Stoffen

Mischungsverhältnis: EC₀₁ der Komponenten

48 Wirkdaten und 12 Kontrollen

G.Logit2: Wirkung=1-1/(1+exp(-31.70+11.558*(log10(Konzentration))))**6.5291



EC-Werte [µmol/L]: EC01 = 152.228 [136.300:168.973]

EC10 = 243.460 [231.844:254.975]

EC50 = 357.562 [348.083:366.014]

EC90 = 465.899 [453.206:479.060]

NOEC = 247.44 µmol/L. LOEC = 266.3 µmol/L

Anhang E Vorhergesagte und beobachtete Effekt- Konzentrationen multipler Gemische

	Seite
E1 Algentoxizität der Gemische <i>ähnlicher</i> Wirkung im Algentest	
Mischungsverhältnis: EC ₅₀ der Komponenten	312
Mischungsverhältnis: EC ₀₁ der Komponenten.....	313
E2 Bakterientoxizität der Gemische <i>ähnlicher</i> Wirkung im Leuchtbakterientest	
Mischungsverhältnis: EC ₅₀ der Komponenten.....	314
Mischungsverhältnis: EC ₀₁ der Komponenten.....	315
E3 Algentoxizität der Gemische <i>unähnlicher</i> Wirkung im Algentest	
Mischungsverhältnis: EC ₅₀ der Komponenten.....	316
Mischungsverhältnis: EC ₀₁ der Komponenten.....	317
E4 Bakterientoxizität der Gemische <i>unähnlicher</i> Wirkung im Leuchtbakterientest	
Mischungsverhältnis: EC ₅₀ der Komponenten.....	318
Mischungsverhältnis: EC ₀₁ der Komponenten.....	319

Tabelle E1.1: Toxizität des Gemisches *ähnlicher* Wirkung im Algentest
(Mischungsverhältnis: EC₅₀ der Komponenten)

Effekt [%]	EC beobachtet [µmol/L]	EC vorhergesagt [µmol/L] nach		IPQ nach	
		KA	UW	KA	UW
10	0.020 [0.016 — 0.024]	0.035 [0.031 — 0.037]	0.045 [0.028 — 0.064]	0.693 [0.110 — 1.441]	1.207 [0.455 — 2.501]
20	0.047 [0.041 — 0.053]	0.064 [0.061 — 0.067]	0.097 [0.073 — 0.123]	0.351 [0.137 — 0.681]	1.050 [0.634 — 1.857]
30	0.078 [0.071 — 0.082]	0.092 [0.089 — 0.094]	0.153 [0.123 — 0.184]	0.182 [0.106 — 0.349]	0.973 [0.657 — 1.568]
40	0.110 [0.102 — 0.114]	0.119 [0.117 — 0.121]	0.214 [0.178 — 0.251]	0.080 [0.028 — 0.149]	0.946 [0.623 — 1.289]
50	0.145 [0.138 — 0.149]	0.147 [0.144 — 0.153]	0.283 [0.244 — 0.325]	0.014 [-0.044 — 0.063]	0.958 [0.671 — 1.178]
60	0.181 [0.173 — 0.186]	0.176 [0.173 — 0.185]	0.362 [0.320 — 0.408]	-0.028 [-0.090 — 0.019]	1.005 [0.794 — 1.197]
70	0.219 [0.210 — 0.227]	0.208 [0.205 — 0.218]	0.458 [0.412 — 0.508]	-0.054 [-0.115 — -0.007]	1.094 [0.872 — 1.292]
80	0.262 [0.252 — 0.272]	0.246 [0.242 — 0.251]	0.585 [0.535 — 0.638]	-0.062 [-0.111 — 0.013]	1.235 [1.025 — 1.540]
90	0.318 [0.302 — 0.346]	0.301 [0.295 — 0.308]	0.782 [0.730 — 0.841]	-0.056 [-0.191 — 0.034]	1.461 [1.150 — 1.907]

Alle Effektkonzentrationen und IPQ-Werte sind mit den entsprechenden 95%-Konfidenzbereichen angegeben

Tabelle E1.2: Toxizität des Gemisches *ähnlicher* Wirkung im Algentest
(Mischungsverhältnis: EC₀₁ der Komponenten)

Effekt [%]	EC <i>beobachtet</i> [µmol/L]	EC <i>vorhergesagt</i> [µmol/L] nach		IPQ nach	
		KA	UW	KA	UW
10	0.030 [0.023 — 0.035]	0.029 [0.027 — 0.030]	0.055 [0.041 — 0.068]	-0.027 [-0.275 — 0.260]	0.874 [0.282 — 1.685]
20	0.048 [0.043 — 0.052]	0.048 [0.046 — 0.049]	0.101 [0.085 — 0.116]	-0.005 [-0.118 — 0.133]	1.101 [0.731 — 1.569]
30	0.064 [0.061 — 0.067]	0.065 [0.063 — 0.066]	0.143 [0.127 — 0.161]	0.010 [-0.042 — 0.074]	1.245 [0.930 — 1.543]
40	0.079 [0.077 — 0.080]	0.081 [0.079 — 0.082]	0.186 [0.169 — 0.205]	0.023 [-0.007 — 0.061]	1.366 [1.133 — 1.605]
50	0.093 [0.091 — 0.096]	0.097 [0.095 — 0.098]	0.231 [0.212 — 0.251]	0.036 [0.001 — 0.073]	1.478 [1.265 — 1.705]
60	0.108 [0.105 — 0.113]	0.113 [0.112 — 0.115]	0.280 [0.259 — 0.299]	0.046 [-0.002 — 0.088]	1.585 [1.375 — 1.807]
70	0.125 [0.121 — 0.132]	0.132 [0.130 — 0.134]	0.337 [0.313 — 0.356]	0.052 [0.000 — 0.101]	1.689 [1.477 — 1.893]
80	0.147 [0.140 — 0.154]	0.154 [0.152 — 0.157]	0.409 [0.385 — 0.428]	0.048 [-0.004 — 0.105]	1.782 [1.569 — 1.967]
90	0.182 [0.170 — 0.198]	0.186 [0.182 — 0.189]	0.515 [0.491 — 0.535]	0.021 [-0.083 — 0.099]	1.834 [1.481 — 2.038]

Alle Effektkonzentrationen und IPQ-Werte sind mit den entsprechenden 95%-Konfidenzbereichen angegeben

Tabelle E2.1: Toxizität des Gemisches *ähnlicher* Wirkung im Bakterientest
(Mischungsverhältnis: EC₅₀ der Komponenten)

Effekt [%]	EC beobachtet [µmol/L]	EC vorhergesagt [µmol/L] nach		IPQ nach	
		KA	UW	KA	UW
10	4.392 [3.738 — 5.155]	5.100 [4.300 — 5.860]	6.958 [4.648 — 10.975]	0.161 [-0.081 — 0.476]	0.584 [0.014 — 1.574]
20	9.827 [8.919 — 10.814]	10.969 [10.307 — 11.573]	16.902 [13.383 — 22.948]	0.116 [-0.005 — 0.261]	0.720 [0.332 — 1.370]
30	15.740 [14.810 — 16.678]	17.325 [16.761 — 18.031]	28.382 [23.945 — 34.574]	0.101 [0.021 — 0.186]	0.803 [0.501 — 1.218]
40	21.988 [21.199 — 22.747]	24.316 [23.736 — 25.104]	41.070 [36.051 — 47.771]	0.106 [0.059 — 0.164]	0.868 [0.620 — 1.202]
50	28.496 [27.878 — 29.095]	32.259 [31.546 — 33.055]	55.225 [49.350 — 62.198]	0.132 [0.097 — 0.170]	0.938 [0.725 — 1.205]
60	35.226 [34.476 — 35.907]	41.693 [40.832 — 42.614]	71.524 [64.579 — 78.974]	0.184 [0.150 — 0.226]	1.030 [0.834 — 1.261]
70	42.184 [41.001 — 43.189]	53.625 [52.545 — 54.820]	91.210 [83.973 — 99.054]	0.271 [0.231 — 0.323]	1.162 [0.980 — 1.370]
80	49.539 [47.856 — 50.966]	70.331 [68.815 — 72.129]	117.039 [108.97 — 125.656]	0.420 [0.370 — 0.487]	1.363 [1.191 — 1.557]
90	58.263 [56.140 — 60.173]	99.238 [96.033 — 103.428]	157.314 [148.63 — 165.755]	0.703 [0.619 — 0.804]	1.700 [1.517 — 1.882]

Alle Effektkonzentrationen und IPQ-Werte sind mit den entsprechenden 95%-Konfidenzbereichen angegeben

Tabelle E2.2: Toxizität des Gemisches *ähnlicher* Wirkung im Bakterientest
(Mischungsverhältnis: EC₀₁ der Komponenten)

Effekt [%]	EC beobachtet [µmol/L]	EC vorhergesagt [µmol/L] nach		IPQ nach	
		KA	UW	KA	UW
10	7.996 [7.307 — 8.575]	7.522 [7.209 — 8.085]	30.807 [27.357 — 38.503]	-0.063 [-0.161 — 0.067]	2.853 [2.338 — 4.043]
20	11.551 [11.172 — 11.923]	11.010 [10.693 — 11.397]	41.621 [37.949 — 48.404]	-0.049 [-0.097 — 0.005]	2.603 [2.253 — 3.258]
30	14.308 [14.015 — 14.561]	14.134 [13.789 — 14.547]	49.305 [45.684 — 55.305]	-0.012 [-0.043 — 0.027]	2.446 [2.186 — 2.859]
40	16.778 [16.530 — 16.991]	17.266 [16.865 — 17.678]	55.864 [52.322 — 61.043]	0.029 [0.000 — 0.060]	2.330 [2.116 — 2.640]
50	19.174 [18.933 — 19.411]	20.621 [20.112 — 21.068]	62.069 [58.794 — 66.067]	0.075 [0.045 — 0.106]	2.237 [2.073 — 2.453]
60	21.649 [21.391 — 21.916]	24.429 [23.896 — 24.943]	68.388 [65.440 — 72.115]	0.128 [0.098 — 0.157]	2.159 [2.021 — 2.322]
70	24.380 [24.110 — 24.669]	29.050 [28.484 — 29.641]	75.295 [72.609 — 78.467]	0.192 [0.164 — 0.220]	2.088 [1.972 — 2.217]
80	27.677 [27.414 — 27.949]	35.246 [34.572 — 35.966]	83.624 [80.877 — 86.389]	0.273 [0.245 — 0.304]	2.021 [1.922 — 2.133]
90	32.421 [32.157 — 32.656]	45.406 [44.224 — 47.108]	95.683 [93.011 — 98.268]	0.401 [0.359 — 0.456]	1.951 [1.864 — 2.036]

Alle Effektkonzentrationen und IPQ-Werte sind mit den entsprechenden 95%-Konfidenzbereichen angegeben

Tabelle E3.1: Toxizität des Gemisches *unähnlicher* Wirkung im Algentest
(Mischungsverhältnis: EC₅₀ der Komponenten)

Effekt [%]	EC beobachtet [µmol/L]	EC vorhergesagt [µmol/L] nach		IPQ nach	
		KA	UW	KA	UW
10	6.377 [4.500 — 8.245]	4.262 [3.810 — 4.777]	4.214 [2.721 — 6.388]	-0.496 [-1.037 — 0.009]	-0.513 [-1.647 — 0.122]
20	14.250 [12.759 — 16.089]	8.731 [8.278 — 9.209]	11.820 [9.413 — 14.769]	-0.632 [-0.890 — -0.452]	-0.206 [-0.560 — 0.091]
30	22.768 [20.988 — 24.770]	13.020 [12.592 — 13.524]	20.750 [17.639 — 24.373]	-0.749 [-0.940 — -0.599]	-0.097 [-0.323 — 0.104]
40	32.092 [30.073 — 34.484]	17.410 [16.863 — 18.026]	30.418 [26.514 — 35.052]	-0.843 [-1.017 — -0.700]	-0.055 [-0.230 — 0.121]
50	42.537 [40.218 — 45.280]	22.147 [21.475 — 22.816]	40.906 [36.081 — 46.232]	-0.921 [-1.071 — -0.785]	-0.040 [-0.194 — 0.103]
60	54.630 [51.752 — 57.736]	27.527 [26.735 — 28.278]	52.725 [47.186 — 58.531]	-0.985 [-1.130 — -0.858]	-0.036 [-0.171 — 0.087]
70	69.331 [65.599 — 74.975]	34.027 [33.087 — 34.953]	66.845 [60.781 — 72.788]	-1.038 [-1.195 — -0.904]	-0.037 [-0.166 — 0.075]
80	88.725 [81.122 — 99.345]	42.650 [41.344 — 44.314]	85.281 [79.103 — 91.477]	-1.080 [-1.331 — -0.896]	-0.040 [-0.218 — 0.070]
90	119.22 [105.09 — 144.75]	56.491 [53.882 — 59.891]	114.06 [107.24 — 120.51]	-1.110 [-1.647 — -0.839]	-0.045 [-0.362 — 0.097]

Alle Effektkonzentrationen und IPQ-Werte sind mit den entsprechenden 95%-Konfidenzbereichen angegeben

Tabelle E3.2: Toxizität des Gemisches *unähnlicher* Wirkung im Algentest
(Mischungsverhältnis: EC₀₁ der Komponenten)

Effekt [%]	EC beobachtet [µmol/L]	EC vorhergesagt [µmol/L] nach		IPQ nach	
		KA	UW	KA	UW
10	11.703 [10.802 — 12.634]	3.634 [3.381 — 3.864]	11.796 [9.524 — 14.861]	-2.220 [-2.629 — -1.899]	0.008 [-0.239 — 0.358]
20	15.310 [14.697 — 15.988]	5.343 [5.127 — 5.548]	17.342 [14.967 — 20.354]	-1.865 [-2.050 — -1.704]	0.133 [-0.031 — 0.293]
30	18.457 [17.911 — 19.0831]	6.840 [6.604 — 7.077]	21.419 [19.065 — 23.802]	-1.698 [-1.833 — -1.581]	0.160 [0.016 — 0.280]
40	21.632 [21.034 — 22.244]	8.310 [8.084 — 8.608]	24.987 [22.755 — 27.241]	-1.603 [-1.717 — -1.493]	0.155 [0.034 — 0.250]
50	25.139 [24.451 — 25.806]	9.854 [9.614 — 10.161]	28.418 [26.301 — 30.289]	-1.551 [-1.651 — -1.443]	0.130 [0.034 — 0.207]
60	29.353 [28.631 — 30.032]	11.568 [11.321 — 11.913]	31.965 [30.082 — 33.825]	-1.537 [-1.621 — -1.431]	0.089 [0.011 — 0.154]
70	34.951 [34.153 — 35.741]	13.601 [13.315 — 14.008]	35.887 [34.052 — 37.633]	-1.570 [-1.647 — -1.463]	0.027 [-0.038 — 0.082]
80	43.622 [42.018 — 45.744]	16.254 [15.866 — 16.836]	40.660 [38.898 — 42.250]	-1.684 [-1.848 — -1.549]	-0.073 [-0.146 — -0.009]
90	62.108 [56.308 — 72.229]	20.468 [19.723 — 21.277]	47.552 [46.036 — 48.945]	-2.034 [-2.656 — -1.739]	-0.306 [-0.572 — -0.175]

Alle Effektkonzentrationen und IPQ-Werte sind mit den entsprechenden 95%-Konfidenzbereichen angegeben

Tabelle E4.1: Toxizität des Gemisches *unähnlicher* Wirkung im Bakterientest
(Mischungsverhältnis: EC₅₀ der Komponenten)

Effekt [%]	EC beobachtet [µmol/L]	EC vorhergesagt [µmol/L] nach		IPQ nach	
		KA	UW	KA	UW
10	69.2 [62.8 — 76.2]	28.2 [24.9 — 31.2]	34.7 [26.4 — 48.1]	-1.452 [-1.849 — -1.105]	-0.996 [-1.620 — -0.426]
20	99.6 [93.3 — 106.3]	56.6 [53.3 — 59.8]	75.7 [63.2 — 92.3]	-0.760 [-0.921 — -0.604]	-0.317 [-0.579 — -0.033]
30	130.6 [123.3 — 138.2]	85.8 [82.6 — 89.0]	120.9 [104.7 — 140.4]	-0.523 [-0.635 — -0.411]	-0.081 [-0.247 — 0.108]
40	165.6 [156.5 — 174.9]	116.7 [113.4 — 120.3]	172.2 [153.1 — 195.8]	-0.419 [-0.518 — -0.323]	0.040 [-0.093 — 0.214]
50	207.6 [196.7 — 219.2]	150.1 [146.6 — 153.9]	232.3 [210.5 — 259.2]	-0.383 [-0.477 — -0.294]	0.119 [0.002 — 0.267]
60	261.7 [248.8 — 275.4]	187.5 [183.7 — 191.8]	304.9 [280.8 — 333.5]	-0.395 [-0.482 — -0.309]	0.165 [0.059 — 0.296]
70	337.1 [322.2 — 352.4]	231.4 [226.9 — 236.3]	396.3 [371.2 — 427.4]	-0.457 [-0.534 — -0.378]	0.176 [0.083 — 0.289]
80	457.1 [438.6 — 475.9]	287.0 [280.7 — 293.7]	521.3 [494.2 — 554.5]	-0.593 [-0.671 — -0.511]	0.140 [0.060 — 0.224]
90	707.6 [662.8 — 765.9]	371.4 [360.6 — 384.0]	724.1 [693.8 — 758.1]	-0.905 [-1.07 — -0.7669]	0.023 [-0.070 — 0.1139]

Alle Effektkonzentrationen und IPQ-Werte sind mit den entsprechenden 95%-Konfidenzbereichen angegeben

Tabelle E4.2: Toxizität des Gemisches *unähnlicher* Wirkung im Bakterientest
(Mischungsverhältnis: EC₀₁ der Komponenten)

Effekt [%]	EC beobachtet [µmol/L]	EC vorhergesagt [µmol/L] nach		IPQ nach	
		KA	UW	KA	UW
10	243.5 [231.8 — 255.0]	71.1 [68.2 — 74.7]	236.3 [215.2 — 269.5]	-2.426 [-2.656 — -2.163]	-0.030 [-0.143 — 0.127]
20	283.2 [274.5 — 293.0]	96.9 [93.6 — 100.6]	299.6 [280.2 — 327.4]	-1.922 [-2.086 — -1.779]	0.058 [-0.018 — 0.183]
30	311.6 [303.7 — 321.0]	116.2 [112.5 — 119.9]	328.0 [307.8 — 353.1]	-1.682 [-1.823 — -1.571]	0.053 [-0.015 — 0.151]
40	335.5 [327.2 — 344.0]	133.0 [128.7 — 136.7]	349.4 [328.3 — 372.3]	-1.522 [-1.640 — -1.429]	0.041 [-0.031 — 0.113]
50	357.6 [348.1 — 366.0]	149.2 [144.2 — 153.2]	368.2 [347.0 — 388.7]	-1.397 [-1.505 — -1.303]	0.030 [-0.043 — 0.092]
60	379.3 [369.2 — 388.3]	165.9 [160.0 — 170.6]	386.4 [364.7 — 405.3]	-1.287 [-1.391 — -1.194]	0.019 [-0.052 — 0.077]
70	402.3 [391.4 — 412.3]	184.5 [177.2 — 190.8]	405.7 [382.7 — 424.9]	-1.181 [-1.285 — -1.080]	0.008 [-0.058 — 0.064]
80	429.0 [417.2 — 440.1]	207.5 [198.3 — 217.1]	428.0 [403.0 — 448.3]	-1.068 [-1.187 — -0.957]	-0.002 [-0.071 — 0.054]
90	465.9 [453.2 — 479.1]	242.0 [227.2 — 258.8]	459.1 [426.7 — 481.6]	-0.925 [-1.068 — -0.787]	-0.015 [-0.101 — 0.042]

Alle Effektkonzentrationen und IPQ-Werte sind mit den entsprechenden 95%-Konfidenzbereichen angegeben

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Sektion Chemische Ökotoxikologie
Permoserstraße 15
D-04318 Leipzig
Telefon 0341/235-2309
Telefax 0341/235-2401