

# **Kombinationswirkungen von Umweltchemikalien**

Zur Analyse der milieuhängigen Mischungstoxizität von Kontaminanten mit unbekanntem Wirkungsmechanismus in umweltrelevanten Konzentrationen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

**Helge-Alexander Walter**

geb.: 15. August 1967

Halle (Saale), 14. September 2002

**urn:nbn:de:gbv:3-000003960**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003960>]



Verteidigung der vorliegenden Dissertationsschrift  
vor der Prüfungskommission der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

am 20. Februar 2002

Gutachter:

1. Prof. Dr. G.-J. Krauß, Halle
2. Prof. Dr. G. Schüürmann, Leipzig
3. PD Dr. H.-T. Ratte, Aachen



Zwei klatschende Hände.

Welchen Klang macht die linke Hand?



<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1	Einführung in die Analyse von Kombinationswirkungen.....	3
1.2	Konzepte zur Berechnung von Erwartungen für Kombinationseffekte.....	7
1.3	Kenntnisse zur Wirkungsweise als Voraussetzung für die Anwendung eines Konzeptes.....	9
1.4	Vergleich der konzeptabhängigen Vorhersagen.....	13
1.5	Methoden und Modelle zur Analyse von Kombinationswirkungen.....	15
1.6	Kombinationswirkungen von Umweltchemikalien.....	17
1.7	Fragestellungen der Arbeit.....	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.1	Algentoxizitätstest.....	27
2.2	Auswahl der Mischungskomponenten.....	33
2.3	Konzentrations-Wirkungs-Analyse.....	39
2.3.1	Experimentelles Design.....	39
2.3.2	Validierung von Konzentrationen und Stabilität der Testsubstanzen.....	41
2.3.3	Schätzung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen.....	44
2.4	Kombinations-Wirkungs-Analyse .....	47
2.4.1	Konzeption.....	47
2.4.2	Experimenteller Ansatz.....	48
2.4.3	Vorhersagen der Mischungstoxizität.....	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>
3.1	Untersuchungen zur Algentoxizität der Mischungskomponenten.....	57
3.1.1	Charakterisierung der Testsubstanzen.....	57
3.1.2	Einzelstofftoxizitäten im Algenbiotest.....	62
3.1.3	Wirkungsspezifität.....	67
3.2	Untersuchungen zur Algentoxizität der multiplen Mischung.....	71
3.2.1	Beobachtbarkeit.....	71
3.2.2	Vorhersagbarkeit.....	76
3.2.3	Stabilität der Vorhersagbarkeit.....	82

3.3	Abhängigkeit der Kombinationswirkung vom Milieufaktor pH.....	89
3.3.1	Charakterisierung der pH-Wert abhängigen Toxizität von 2,4,5-Trichlorphenol	89
3.3.2	Einfluß des pH-Wertes auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung von Kombinationswirkungen.....	92
3.3.3	Zu den Ursachen pH-Wert-abhängiger Toxizität ionogener Substanzen.....	96
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>117</b>
4.1	Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung von Umweltchemikalien	117
4.1.1	Sicherheit der Ergebnisse.....	118
4.1.2	Abweichungen von der Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG.....	124
4.1.3	Unkenntnis der Wirkungsmechanismen.....	132
4.1.4	Fazit.....	136
4.2	Einfluß des Milieufaktors pH auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung von Kombinationswirkungen.....	139
4.3	Zu den Ursachen pH-Wert-abhängiger Toxizität.....	143
4.4	Niedrige Effektkonzentrationen.....	149
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>155</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>161</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>171</b>

# 1 Einleitung



---

# 1 Einleitung

Kombinationswirkungen von Chemikalien sind nicht nur Gegenstand der Gedankenwelt von spezialisierten Wissenschaftlern: man begegnet ihnen in vielen Bereichen, auch in Bereichen des alltäglichen Lebens. Jeder, der schon einmal mehr als eine Aspirin-Tablette gleichzeitig oder nacheinander eingenommen hat, ist mit Kombinationswirkungen in Berührung gekommen. In Anbetracht unsäglicher Kopfschmerzen mag sich manch eine die Frage gestellt haben, ob die Einnahme der zweiten Tablette denn nun zu einer (erhofften) Verdopplung der Wirkung der ersten führt, oder nicht.

Die Analyse von Kombinationswirkungen von Mischungen aus Chemikalien, wie sie in der Umwelt zu finden sein könnten, insbesondere die Vorhersagbarkeit der von solchen Mischungen erzeugten ungewollten Effekte, ist Gegenstand dieser Arbeit. Nachdem zu Beginn in die Analyse von Kombinationswirkungen eingeführt wird (Kapitel 1.1), werden Vorstellungen über das Zusammenwirken von Chemikalien (Konzepte) und die damit zusammenhängende Möglichkeit, eine zu erwartende Toxizität einer Mischung zu berechnen, dargestellt (Kapitel 1.2). Anschließend wird die Bedeutung der Wirkungsweisen der Komponenten für die Verwendung der Konzepte betrachtet (Kapitel 1.3), und nachfolgend die Prognosen der Mischungstoxizität, die aufgrund der vorgestellten Konzepte berechnet werden können, miteinander verglichen (Kapitel 1.4). Nachdem Methoden und Modelle zur Analyse von Kombinationswirkungen vorgestellt worden sind (Kapitel 1.5), soll in die speziell für Mischungen aus Umweltchemikalien bestehenden ungeklärten Fragen eingeführt werden (Kapitel 1.6), auf denen die Fragestellungen der vorliegenden Untersuchung aufbauen (Kapitel 1.7).

## 1.1 Einführung in die Analyse von Kombinationswirkungen

Die Analyse von Kombinationswirkungen ist seit fast einem Jahrhundert Gegenstand wissenschaftlichen Interesses. Die theoretischen Fundamente haben ihren Ursprung in der Pharmakologie und der Biometrie. Eine Arbeit von Loewe und Muischnek (1926) führte zur Methode der Isobolographie, die begründete, was später als Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT bekannt wurde: eine pharmakologisch-theoretische Vorstellung über die Wirkungsweise von Chemikalien in einer Mischung. In einer Reihe von Publikationen der Biometriker Bliss (1939), Finney (1942), Plackett und Hewlett (1948) und Ashford (1958) wurden von einem probabilistischen Standpunkt aus Modelle für EINFACH

ÄHNLICHE WIRKUNG und UNABHÄNGIGE WIRKUNG abgeleitet, was den statistischen Hintergrund der *Kombinations-Wirkungs-Analyse* lieferte. Seitdem hielt die Kombinations-Wirkungs-Analyse als Verfahren Einzug in die unterschiedlichsten Wissenschaftsdisziplinen wie Agrarwissenschaften, Krebsforschung, Enzymologie, Epidemiologie, Hygiene, Medizin, Pharmakologie, Toxikologie und Ökotoxikologie und war Gegenstand zahlreicher experimenteller Studien.

Für die Kombinations-Wirkungs-Analyse können drei Verwendungsmöglichkeiten unterschieden werden (Bödeker et al., 1992): die qualitative Beschreibung von Wirkorten und –weisen von Chemikalien, die quantitative Beurteilung von Kombinationswirkungen und die Prognose des von einem Chemikaliengemisch ausgehenden Risikos.

Historisch fokussierte die Analyse von Kombinationswirkungen auf die Untersuchung von Wirkstoff-Rezeptor-Interaktionen mit dem Ziel, die Wirkorte und Wirkungsweisen der Substanzen zu charakterisieren (Pöch, 1993). Dazu werden experimentell ermittelte Mischungstoxizitätsdaten mit Erwartungen, die auf Annahmen über ihre Wirkungsweise beruhen, verglichen und auf eine Abweichung oder Übereinstimmung hin überprüft.

Für die Anwendungen von Kombinationswirkungen von Substanzen beispielsweise im therapeutischen oder agrarwissenschaftlichen Bereich sind hingegen *qualitative* Aspekte von Kombinationswirkungen, wie z. B. die Beschreibung der Wirkungsweise der Komponenten, sekundär. In diesen Wissenschaftszweigen besteht das Interesse oft primär in der Optimierung gewollter Effekte (wie etwa die Kontrolle von Schädlingsepidemien durch Reduktion der eingesetzten Pestizidmengen; Barrett, 1993) oder im Schutz vor ungewollten Effekten (zum Beispiel der Eliminierung oder Reduktion von ungewollter Wirkungsverstärkung bei gleichzeitiger Applikation von Alkohol und Beruhigungsmitteln; Pöch, 1993), die durch Mischungen von Chemikalien erzeugt werden, bzw. erzeugt werden können. Der Fokus liegt hier in der *quantitativen* Beurteilung von Kombinationseffekten, das heißt, die Frage ist, ob diese größer (synergistisch) oder kleiner (antagonistisch) sind als aufgrund der Einzelstoffeffekte erwartet werden kann.

Die zunehmende Wahrnehmung, daß Organismen nicht nur einzelnen Chemikalien, sondern in der Regel mehreren Substanzen gleichzeitig oder nacheinander ausgesetzt sind, führte fast zwangsläufig zu der Frage nach dem Gefährdungspotential durch mögliche Interaktionen der Substanzen. Die Kombinations-Wirkungs-Analyse wird in diesem Zusammenhang zur Beurteilung des Risikos von Chemikaliengemischen eingesetzt: sowohl prospektiv, d. h. wenn ausschließlich Toxizitätsinformationen der Einzelstoffe bekannt sind, wie auch retrospektiv, d. h. wenn darüber hinaus auch die Toxizität des

Chemikaliengemisches vorliegt. Insbesondere im Rahmen von Risikomanagement und Chemikalienregulation wird beabsichtigt, die Beurteilung des von Stoffgemischen ausgehenden Risikos nicht empirisch - das heißt von Fall zu Fall - durchzuführen, sondern Risikobeurteilungen prospektiv in Form von Vorhersagen einer aufgrund der Einzelstofftoxizitäten zu erwartenden Mischungstoxizität für ganze Gruppen von Chemikalien, zum Beispiel mit ähnlichen oder unähnlichen Wirkungsmechanismen, verwenden zu können (Altenburger et al., 1996).

Interaktionen von Chemikalien, die gegenseitig die Wirkungsqualitäten und Wirkungsquantitäten der beteiligten Komponenten verändern, sind auf unterschiedliche Weise vorstellbar. Eine Substanz könnte zum Beispiel die Absorption, die Verteilung, den Metabolismus oder die Elimination einer anderen beeinflussen. Denkbar ist auch die Veränderung der Sensitivität eines Organismus oder spezieller, eines Targets einer Substanz durch eine andere. In Abgrenzung zu Wechselwirkungen auf biologischer Ebene könnten zwei oder mehrere Chemikalien aber auch physikalisch oder chemisch miteinander reagieren. Biologische oder chemische Interaktionen von Chemikalien werden häufig im Sinne einer Verstärkung oder Reduktion der Wirkung einer Chemikalie durch eine andere verstanden. Diese Vorstellung enthält schon implizit die Annahme, daß auch Kombinationswirkungen beschrieben werden können, bei denen sich die beteiligten Substanzen nicht gegenseitig in ihren Wirkungen beeinflussen, sondern unabhängig voneinander effektiv sind.

Da jegliche Prognose und Beurteilung einen Bezugspunkt benötigt, besteht der Kern jeder Analyse von Kombinationswirkungen darin, zu formulieren, welche Kombinationswirkung einer Mischung auf Basis der Einzelstoffinformationen *erwartet* werden kann. Neben qualitativen Vorstellungen über das Zusammenwirken der Substanzen spielen dabei insbesondere quantitative Beobachtungen der Wirkintensität der Einzelstoffe und der Mischung eine wichtige Rolle. Auch bei der Beschreibung, Beurteilung und Prognose von Kombinationswirkungen ist die Unterscheidung von qualitativen und quantitativen Bezügen von Bedeutung. Da für die Berechnung des zu erwartenden Mischungseffektes divergierende Vorstellungen über die Wirkungsweise und die Art des Zusammenwirkens der Mischungskomponenten zur Verfügung stehen, kann diese Referenzaktivität für eine identisch zusammengesetzte Mischung sehr unterschiedlich sein. Die Frage nach dem Bezugssystem zur Vorhersage und Beurteilung der Kombinationseffekte stellt sich daher für jedes zu beurteilende Chemikaliengemisch neu.

---

## 1.2 Konzepte zur Berechnung von Erwartungen für Kombinationseffekte

### DAS KONZEPT DER KONZENTRATIONSADDITIVITÄT

Der konzeptionelle Gedanke der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT wurde in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts von Loewe und Muischnik (1926) und Loewe (1927) eingeführt. Konzentrationsadditivität in ihrer einfachsten Form besteht demnach dann, wenn sich eine Substanz wie die Verdünnung einer anderen verhält. Diese Vorstellung hat ihren Ursprung in der Überlegung, eine Substanz mit sich selbst zu mischen, was mit dem Ausdruck *sham combination* bezeichnet wird. Mathematisch ausgedrückt ist das Zusammenwirken von 2 Substanzen konzentrationsadditiv (Berenbaum, 1985), wenn

$$\frac{C_1}{EC_{x,1}} + \frac{C_2}{EC_{x,2}} = 1 \quad [ \text{Gl. 1} ]$$

wobei  $C_1$  und  $C_2$  die Konzentrationen der Substanzen 1 und 2 in der Mischung bezeichnen, die zusammen einen Effekt  $x$  generieren (z. B. 50%).  $EC_{x,1}$  und  $EC_{x,2}$  bezeichnen die Konzentrationen, bei denen die Komponenten einzeln denselben Effekt  $x$  erzielen, den sie gemeinsam als Mischung erzeugen. Die Formel steht für die Vorstellung, daß eine Substanz 1 ganz oder teilweise durch eine Substanz 2 ersetzt werden kann, ohne daß sich der Effekt ändert, sprich die Addition der Konzentrationen beider Substanzen den selben Effekt auslöst. Dabei muß die Menge der Substanz 2 den gleichen Effekt in der Mischung erzeugen wie die substituierte Substanzmenge von 1, muß also gleich-effektiv - *äqui-effektiv* - sein. Anders ausgedrückt: Im Fall des konzentrationsadditiven Zusammenwirkens der Substanzen addieren sich die Konzentrationen der Komponenten in der Mischung,  $C_1$  und  $C_2$ , ausgedrückt als fraktionaler Teil ihrer Effektkonzentrationen (*toxic units*), immer zu dem Wert 1.

Die Tauglichkeit des Konzeptes der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT für Zwecke der Prognose von Mischungstoxizitäten für aquatische Organismen ist in einer Reihe von Studien für Mischungen aus ähnlich wirkenden Industriechemikalien (Könemann, 1980, 1981; Hermens et al., 1984a, 1985a, 1985b; Broderius und Kahl, 1985; De Wolf et al., 1988) und Wirkstoffen (Altenburger et al. 2000; Backhaus et al., 2000) gezeigt worden. Aber auch für Mischungen aus Chemikalien mit als nicht-ähnlich antizipierten Wirkungsmechanismen wurde die prinzipielle Anwendbarkeit dieses Konzeptes postuliert und experimentell demonstriert (Hermens und Leeuwangh, 1982; Hermens et al., 1984b, 1985c). Es wird daher von einigen Autoren auch als *generelle Lösung (general solution)* für die Vorhersage von Mischungstoxizitäten diskutiert (Berenbaum, 1985).

#### DAS KONZEPT DER UNABHÄNGIGEN WIRKUNG

Das Konzept der *Unabhängigen Wirkung* wurde 1939 von Bliss eingeführt. In Abgrenzung zum Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT beruht das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG auf der Vorstellung, daß die primären Interaktionen der Mischungskomponenten an unterschiedlichen Wirkorten stattfinden und die Substanzen der Mischung über unterschiedliche, voneinander unabhängige Wirkketten einen gemeinsamen Effekt auslösen. Für ein binäres Gemisch wird dieser Zusammenhang mathematisch ausgedrückt als (Berenbaum, 1985):

$$E(c_{1,2}) = E(c_2) + (1 - E(c_2)) \cdot E(c_1) \quad [ \text{Gl. 2} ]$$

b.z.w.

$$E(c_{1,2}) = E(c_1) + (1 - E(c_1)) \cdot E(c_2) \quad [ \text{Gl. 3} ]$$

was überführt werden kann in

$$E(c_{1,2}) = E(c_1) + E(c_2) - E(c_1) \cdot E(c_2) \quad [ \text{Gl. 4} ]$$

In einer bildhaften Übersetzung dieser Vorstellung eines unabhängigen Zusammenwirkens von Komponenten eines binären Gemisches würde Substanz B *die* Individuen einer Population töten, die den vorangegangenen "Angriff" von Substanz A überlebt haben.

Die Tauglichkeit des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG zur Prognose von Mischungstoxizitäten für aquatische Organismen ist in einer Reihe von Studien für Mischungen aus unähnlich wirkenden Wirkstoffen gezeigt worden (Backhaus et al., 2000; Faust et al., 2000). Die generelle Tauglichkeit des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG wird jedoch insbesondere für die Ebene integraler Effektparameter angezweifelt (Berenbaum, 1985; Sühnel, 1990). UNABHÄNGIGE WIRKUNG beruht auf der Annahme, daß die Wirkungsmechanismen der Substanzen von ihrer primären molekularen Interaktion z. B. mit einem Rezeptor über weitere Stationen einer Wirkkette bis hinauf zu der Ebene, auf der letztendlich die Wirkung detektiert wird (z. B. Tod eines Organismus), tatsächlich unabhängig sind. Fraglich ist, ob die Unabhängigkeit solcher Wirkketten in komplexen biologischen Systemen mit mannigfaltigen Wechselwirkungen der physiologischen Prozesse tatsächlich eine reale Annahme darstellt. Daher wird diesem Konzept zum Teil nur als Spezialfall von KONZENTRATIONSADDITIVITÄT Bedeutung beigemessen (Berenbaum, 1985; Sühnel, 1990).

### 1.3 Kenntnisse zur Wirkungsweise als Voraussetzung für die Anwendung eines Konzeptes

Die Konzepte zur Vorhersage einer Kombinationswirkung eines Chemikaliengemisches, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, basieren auf unterschiedlichen Vorstellungen über die Wirkungsweisen der Mischungskomponenten und über die Art ihres Zusammenwirkens (vgl. Kapitel 1.2). Während das Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT auf der Vorstellung beruht, daß die Komponenten einer Mischung ähnliche Wirkungsmechanismen besitzen, basiert das konkurrierende Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG auf der Annahme unähnlicher Wirkungsmechanismen und einer voneinander unabhängigen Wirkung der Chemikalien.

Die Verwendung entweder des einen oder des anderen Konzeptes kann zu quantitativ erheblich unterschiedlichen Vorhersagen der Toxizität eines Chemikaliengemisches führen, was bei der prospektiven Bewertung des Gefährdungspotentials der Mischung unterschiedliche Interpretationen zur Folge haben kann. Aber auch wenn eine experimentell ermittelte Kombinationswirkung beurteilt werden soll, d. h. wenn die Frage ist, ob sie im Vergleich zur berechneten Kombinationswirkung eines Stoffgemisches größer (synergistisch) oder kleiner (antagonistisch) ist oder ihr entspricht, kann die Verwendung des einen oder des anderen Konzeptes zur Berechnung der *Referenztoxizität* unterschiedliche Schlußfolgerungen implizieren. Es ist zum Beispiel der Fall möglich, daß für zwei Substanzen unähnliche Wirkungsmechanismen angenommen werden und infolgedessen nach dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG eine zu erwartende Toxizität für die Mischung berechnet wird. Eine experimentell ermittelte Toxizität des binären Gemisches, die höher als erwartet ausfällt, wird als Synergismus beurteilt. Dasselbe experimentelle Ergebnis der Mischungstoxizität, ermittelt unter identischen Bedingungen mit identischen Substanzen könnte aber auch von einem anderen Experimentator als Antagonismus interpretiert werden. Nämlich dann, wenn dieser eine ähnliche Wirkungsweise der Substanzen annimmt und das experimentelle Ergebnis mit der zu erwartenden Mischungstoxizität vergleicht, die nach dem Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT berechnet wurde.

Diese von Bödeker et al. (1992) als "assessment dilemma" bezeichnete Situation entsteht allein dadurch, daß zwei konkurrierende Konzepte für die Vorhersage und Beurteilung der Toxizität von Stoffgemischen zur Verfügung stehen. Da die Konzepte auf entgegengesetzten Annahmen über die Wirkungsweisen der Mischungskomponenten beruhen, ist die Verwendung der Konzepte direkt mit der Frage nach der Einteilung der Chemikalien des betreffenden Gemisches in Kategorien ähnlicher und unähnlicher Wirkung verbunden.

Allerdings ist noch weitgehend unklar, wie ähnliche und unähnliche Wirkung verstanden werden müssen, damit entweder das eine oder das andere Konzept, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT oder UNABHÄNGIGE WIRKUNG, zur Vorhersage und Beurteilung der Kombinationswirkung eines bestimmten Chemikaliengemisches taugt (Grimme et al., 1996b). Eine Vorstellung betrachtet Chemikalien als ähnlich wirkend, wenn ihre Wirkungsweisen als unspezifisch beschrieben werden können (Könemann, 1980), d. h. ausschließlich auf Membranstörungen basieren (Lipnick et al., 1985). Der Annahme folgend, daß ein wesentlicher Teil der in der Umwelt auftretenden Chemikalien eine unspezifische Wirkungsweise besitzt (Bol et al., 1993), wird das Vorkommen ähnlicher Wirkung von Substanzen als die Regel, unähnliche Wirkung von Substanzen hingegen als die Ausnahme beurteilt. Dementsprechend wird dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG zur Vorhersage und Beurteilung der Kombinationswirkung eines Chemikaliengemisches teilweise auch nur als Spezialfall von KONZENTRATIONSADDITIVITÄT Bedeutung eingeräumt (Berenbaum, 1985). In einer anderen Vorstellung hingegen besitzen Substanzen nur dann eine ähnliche Wirkungsweise, wenn ihre primären Wirkorte und ihre spezifischen Molekül-Rezeptor Interaktionen identisch sind (Pöch, 1993). Das Auftreten ähnlicher, spezifischer Wirkung wird ferner als die Ausnahme beurteilt und das Vorkommen unähnlicher Wirkung als die Regel. Dementsprechend wird für die Vorhersage und Beurteilung von Kombinationswirkungen dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG primäre Bedeutung beigemessen (Streffer et al., 2000).

Für Wirkstoffe mit einerseits bekannten, spezifischen und ähnlichen Wirkungsmechanismen und andererseits bekannten, spezifischen und unähnlichen Wirkungsmechanismen ist die prinzipielle Tauglichkeit beider Konzepte, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, zur Vorhersage ihrer Kombinationswirkung in aquatischen Biotesten, inzwischen experimentell eindrücklich belegt worden (Altenburger et al., 2000; Backhaus et al., 2000; Faust et al., 2000). Für die überwiegende Anzahl der Chemikalien, die in der Umwelt auftreten, liegen allerdings nur ungenügende oder keine Informationen über die Spezifität ihrer Wirkungen bzw. über ihre Wirkungsmechanismen vor. Eine Einteilung dieser Substanzen in Gruppen mit ähnlicher und unähnlicher Wirkung ist somit ohne weiteres nicht möglich (vgl. Kapitel 1.6). Ein Ansatz, solche Chemikalien dennoch in Gruppen mit ähnlicher Wirkung einzuteilen, verwendet weiter gefaßte Kriterien. Diese beruhen auf Beobachtungsparametern, die biologische Effekte der Substanzen nicht auf der Ebene molekularer Wechselwirkungen beschreiben, sondern auf verschiedenen Ebenen biologischer Organisation (z. B. Reproduktion) (Könemann, 1980; Van Leeuwen, 1991). Zur Klassifizierung von Chemikalien, deren Wirkungsmechanismen unbekannt sind, werden nicht selten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ("Structure-activity relationships", kurz SARs)

verwendet, um Kontaminanten in große Gruppen mit grober struktureller Ähnlichkeit einzuteilen (Verhaar et al., 1992). Zur Berechnung einer minimal zu erwartenden Wirkungsintensität einer Substanz wird der die Lipophilie beschreibende Deskriptor  $\log K_{ow}$  einer Reihe von Substanzen mit ihrer Toxizität korreliert und diese Beziehung regressionsanalytisch beschrieben. Ein Rational für die Verwendung von solchen quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen ("quantitative structure-activity relationship", kurz QSAR) zur Einteilung von Chemikalien in Gruppen mit ähnlicher Wirkung besteht darin, daß Substanzen einer QSAR einen ähnlichen Wirkungsmechanismus besitzen könnten (Hermens et al., 1985b). Aber auch bei dieser Anwendung von QSARs gibt es unterschiedliche Ansichten über die Art ihrer Verwendung. Calamari und Vighi (1992) zufolge sollen die Substanzen nicht nur eine QSAR teilen, sondern zusätzlich gemeinsame chemische Grundstrukturen besitzen.

Unabhängig davon, ob die Wirkungsmechanismen der Chemikalien einer Mischung bekannt oder unbekannt sind, ist die Frage unbeantwortet, wie unähnlich ähnliche (bzw. wie ähnlich unähnliche) Wirkungsmechanismen der Mischungskomponenten sein dürfen, damit das Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT (UNABHÄNGIGEN WIRKUNG) noch taugt. Denn auch wenn die Mischungskomponenten in ihren primären Interaktionen auf niedriger, z. B. molekularer Organisationsstufe, tatsächlich unterschiedlich sind und unabhängig voneinander einen jeweils spezifischen Primäreffekt auslösen, ist es durchaus vorstellbar, daß die von den Substanzen ausgelösten „Effektketten“ auf höheren biologischen Organisationsstufen (z. B. Zelle, Organ, Organismus, Population) ähnliche Effekte auslösen, so daß mit einem Toxizitätsparameter auf diesem Organisationsniveau (z. B. Inhibition der Reproduktion auf Populationsebene) die Kombinationswirkung der Mischung als konzentrationsadditiv beurteilt werden könnte. Hinweise für eine Abhängigkeit der Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität mit dem einen oder dem anderen Konzept von der biologischen Organisationsstufe des gewählten Toxizitätsparameters geben Mischungsstudien von Hermens et al. (1984b). Sie untersuchten die Toxizität einer Mischung aus 14 Substanzen mit verschiedenen Strukturen und antizipierten unähnlichen Wirkungsmechanismen mit den Toxizitätsparametern Reproduktionshemmung und Mortalität in Daphnien. Für beide Toxizitätsparameter wurde eine Übereinstimmung der beobachteten Mischungstoxizität mit der Vorhersage nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT festgestellt. Im Vergleich zur Mortalität war die Mischungstoxizität bei Verwendung des Parameters Reproduktionshemmung allerdings reduziert, was auch schon in früheren, ähnlichen Experimenten (Hermens et al., 1984a) beobachtet wurde. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß das Potential für Konzentrationsadditivität bei Verwendung von Parametern niedrigerer biologischer Organisationsstufen geringer ist.

Zusammenfassend ist nicht nur weitgehend unklar, was unter (un)ähnlicher Wirkung verstanden werden muß, sondern darüber hinaus, wie unähnlich *ähnliche* bzw. wie ähnlich *unähnliche* Wirkungen sein dürfen, damit das eine oder das andere Konzept, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT oder UNABHÄNGIGE WIRKUNG, zur Vorhersage und Beurteilung eines bestimmten Chemikaliengemisches taugt. Für Chemikalien, deren Wirkungsmechanismen unbekannt sind, ist ferner ungeklärt, wie diese Substanzen in Kategorien ähnlicher bzw. unähnlicher Wirkung einzuteilen sind.

## 1.4 Vergleich der konzeptabhängigen Vorhersagen

Die überwiegende Mehrheit bisheriger Studien zu Kombinationswirkungen im Bereich der aquatischen Toxikologie beurteilt die Vorhersagbarkeit der beobachteten Mischungstoxizität ausschließlich durch einen Vergleich mit der Vorhersage nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT (Hermens et al., 1985a, 1985b). Ein Vergleich mit den Prognosen beider Konzepte, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, ist eher die Ausnahme (Altenburger et al., 2000).

Ein direkter Vergleich der Prognosen beider Konzepte, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, ist schwierig, da die Berechnung der Vorhersage der Toxizität eines Stoffgemisches aus unterschiedlichen Blickwinkeln vorgenommen wird. Das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG berechnet einen Mischungseffekt für eine Gesamtkonzentration der Mischung, wobei die *Effekte* der Einzelstoffe verrechnet werden (vgl. Kapitel 1.2 und 2.4.3). Die Komponenten einer binären Mischung erzielen bei bestimmten Konzentrationen einzeln Effekte von z. B. 40 % und 60 %; folglich wird ein zu erwartender Mischungseffekt von 76 % berechnet (vgl. Gl. 4). Für die Berechnung eines Mischungseffektes nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG ist also nur die Kenntnis von für die Berechnung benötigten 'Konzentrations-Effekt-Paaren' notwendig. Die Ermittlung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe über einen größeren Effektbereich, z. B. in Form einer Konzentrations-Effekt-Kurve, ist also nicht erforderlich. Ein Vergleich des nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG berechneten Mischungseffektes von z. B. 76 % mit einer Erwartung nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT ist aber nicht ohne weiteres möglich. Denn in die Berechnung der Vorhersage nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT gehen ausschließlich *Konzentrationen* der Einzelstoffe ein, die gemeinsam einen definierten Mischungseffekt erzielen sollen (vgl. Kapitel 1.2 und Gl. 8, Kapitel 2.4.3). Berechnet wird also die Gesamtkonzentration der Mischung, bei der diese den definierten Effekt generiert. Für jede Komponente der Mischung muß bekannt sein, bei welcher Konzentration sie den Effekt der Mischung, für den die Gesamtkonzentration berechnet werden soll, einzeln erzeugt. Da sich die Effektkonzentrationen der Substanzen in unserem Beispiel unterscheiden ( $EC_{40}$  und  $EC_{60}$ ), können sie für die Berechnung einer Mischungskonzentration nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT für einen Gesamteffekt von 76 % nicht verwendet werden. Dazu ist die Kenntnis der  $EC_{76}$  der Einzelstoffe notwendig, was wiederum zumindest die partielle Kenntnis ihrer Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen voraussetzt. Erst dann kann ein Vergleich der Vorhersagen beider Konzepte vorgenommen werden: z. B. auf der Ebene der Gesamtkonzentrationen der Mischung, die diese nach beiden Prognosen bei einer erwarteten Mischungstoxizität von 76 % besitzen.

---

## 1.5 Methoden und Modelle zur Analyse von Kombinationswirkungen

Bis heute ist eine Vielzahl von Methoden und Modellen zur Analyse von Kombinationswirkungen vorgestellt worden. Eine Übersicht geben Bödeker et al. (1990), die die Modelle nach Ursprung und experimentellen sowie mathematischen Anforderungen gruppieren. Mit ihrer Hilfe sollen Abweichungen der experimentellen Daten von spezifischen Referenzwerten oder -linien, die das Zutreffen bestimmter Annahmen über Art und Intensität des Zusammenwirkens der Mischungskomponenten repräsentieren, detektiert werden. Die Methoden und Modelle basieren zumindest implizit auf den Konzepten zur Analyse von Kombinationswirkungen und können daher auch als deren Umsetzung in Verfahren zur praktischen Datenauswertung beschrieben werden. Beispiele solcher Modelle, die sich auf das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG beziehen, sind *Effect Multiplication* (Colby, 1967) und *Joint Independent Action* (Plackett und Hewlett, 1948). Weitere algebraische Methoden, die auf dem Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT beruhen, sind z. B. *Toxic Unit Summation* (Sprague, 1970) und der *Additivity Index* von Marking (1977). Methoden, die sich auf die zwei genannten Konzepte beziehen, sind z. B. der *Mixture Toxicity Index* (Könemann, 1981) und der *Index on Prediction Quality* (IPQ) von Grimme et al. (1996a). Die algebraischen Modelle mit Bezug auf das Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT haben ihren historischen Ursprung in der graphischen Methode des *Isobogramms* (Loewe und Muischnek, 1926). Sie stellt den Startpunkt wissenschaftlicher Analyse von Kombinationswirkungen dar. Wegen ihrer illustrativen Form ist das Isobogramm immer noch von Bedeutung und wird daher im Folgenden kurz erläutert.

Mit Hilfe des Isobogramms sollen Abweichungen der experimentellen Daten von einer spezifischen Referenzlinie, die Konzentrationsadditivität markiert, detektiert werden. Trägt man die Effekte von zwei Substanzen,  $S_1$  und  $S_2$ , die in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen miteinander kombiniert werden, gegen ihre Konzentrationen auf, in denen sie in der jeweiligen Mischung vorliegen,  $C_1$  und  $C_2$ , so erhält man eine Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Fläche der binären Mischung in einem 3-dimensionalen Raum (Abb. 1, A). Eine Reduktion auf eine 2-dimensionale Abbildung wird erreicht, in dem dieser „Würfel“ bei einem definierten Effektniveau (z. B. 50 %) horizontal geschnitten wird (Abb. 1, B). Die Schnittfläche (von oben betrachtet) wird als Isobogramm bezeichnet. Alle möglichen Gesamtkonzentrationen aus beiden Substanzen, die für den beobachteten Effekt, der dem betrachteten Niveau entspricht (hier: 50 %), berechnet werden können, werden in der Fläche dargestellt. Die Linie, die die Konzentrationen der Komponenten verbindet, bei denen die Komponenten einzeln den selben Effekt erzeugen wie für die Mischung bei konzentrationsadditiven Zusammenwirken erwartet wird, wird *Isobole* (= Linie gleichen

Effektes) genannt. Liegen die Gesamtkonzentrationen, die für die beobachteten Mischungseffekte des betrachteten Niveaus (hier: 50 %) berechnet wurden, auf dieser Linie, wird die Kombinationswirkung als konzentrationsadditiv beurteilt. Subadditive (antagonistische) Kombinationswirkungen ergeben eine konvex verlaufende Linie. Konkave Isobolen charakterisieren superadditive (synergistische) Kombinationswirkungen.

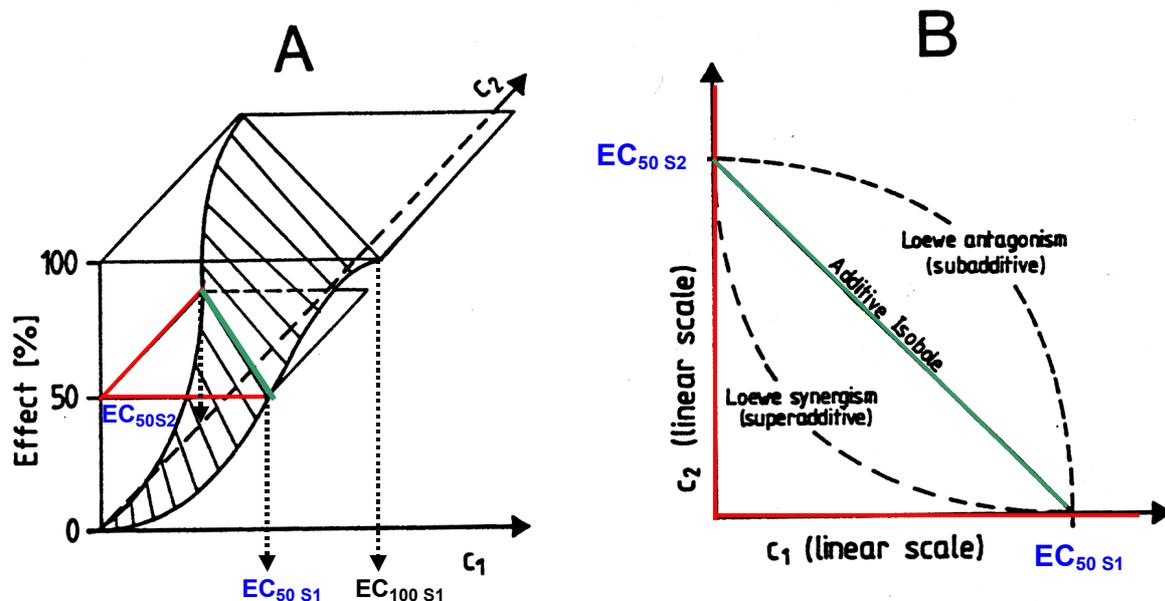


Abb. 1: (A) Konzentrations-Wirkungs-Fläche einer binären Mischung bei angenommenem konzentrationsadditiven Zusammenwirken der Komponenten (in Anlehnung an Altenburger et al., 1990).  
 (B) Isobologramm für ein Effektniveau von 50 % (in Anlehnung an Loewe, 1953).

## 1.6 Kombinationswirkungen von Umweltchemikalien

Die Anzahl der weltweit bekannten organischen und anorganischen Substanzen wird derzeit auf etwa 18 Millionen geschätzt (<http://info.cas.org/cgi-bin/regreport.pl> ; Stand: September 2001). In dem *European Inventory of Existing Chemical Substances (EINECS)* sind annähernd 100.000 Chemikalien identifiziert, zu denen jährlich ca. 5000 neue Chemikalien hinzu kommen (Hansch, 1989). Welche Chemikalien als *Umweltchemikalien* zu bezeichnen sind, ist nicht eindeutig. Dem Chemikaliengesetz zufolge sind Umweltchemikalien im engeren Sinne Produkte der chemischen Industrie, die sich während oder nach ihrer bestimmungsgemäßen Anwendung aus ihrem Anwendungsbereich hinaus in die Umwelt verbreiten. Das für viele Organismen toxische p-Dichlorbenzol wäre demnach solange keine Umweltchemikalie, bis es den bestimmungsgemäßen Anwendungsbereich 'Mottenkugel' verlassen hat. Andere Auffassungen definieren Umweltchemikalien in einem weiteren Sinne, z. B. als Stoffe, die durch menschliches Zutun in die Umwelt gebracht werden und in Mengen und Konzentrationen auftreten können, die geeignet sind, Lebewesen, - insbesondere den Menschen - zu gefährden (Streit, 1994). Die Weltproduktion von organischen Chemikalien beträgt ca. 250 Millionen Tonnen pro Jahr (Korte, 1992) und man geht davon aus, daß wenigstens ein Teil, wenn nicht gar der größte Teil, nach der Anwendung als direkter Stoffeintrag durch unkontrollierten oder nicht gezielten Einatz in die Umwelt gelangt (Korte, 1992). Bei einem weit gefaßten Verständnis von Umweltchemikalien können also fast alle Chemikalien als *Umweltchemikalien* verstanden werden, da sie am Ende ihres Lebenszyklus als Kontaminanten und potentielle Giftstoffe in der Umwelt zu finden sind. Dies vergegenwärtigt nicht nur die Umweltbelastung durch Einzelsubstanzen, sondern insbesondere das Gefährdungspotential durch die enorme Vielfalt von möglichen Kombinationen dieser Einzelsubstanzen und die damit verbundene Schwierigkeit, ihre Kombinationswirkung und das damit verbundene Risiko für die Umwelt zu beurteilen.

### UNKENNTNIS DER WIRKUNGSMECHANISMEN

Umweltchemikalien liegen in hoher Diversität an Strukturen, Wirkungsweisen und toxischen Potentialen vor. Demzufolge sind darunter auch eine Reihe von spezifisch wirkenden Substanzen vertreten, wie z. B. Herbizide, die in Algen spezifische Reaktionen hervorrufen oder Antibiotika, die gleiches in Bakterien induzieren. Falls deren spezifische Wirkungsmechanismen bekannt sind und so eine Einteilung in Gruppen mit ähnlichen und unähnlichen Wirkungsmechanismen möglich ist, können deren Kombinationswirkungen mit dem entsprechenden Konzept, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT oder UNABHÄNGIGE WIRKUNG,

auf Basis der Einzelstofftoxizitäten prognostiziert werden (Altenburger et al., 2000; Backhaus et al., 2000; Faust et al., 2000). Für die Mehrzahl der in der Umwelt auftretenden Chemikalien sind die vorliegenden Informationen allerdings nicht ausreichend, um eine Klassifizierung der Chemikalien in Kategorien ähnlicher und unähnlicher Wirkung zu erlauben. Für 99,99 % aller existierenden Chemikalien liegen keine adäquaten Informationen über Quelle, Effekt und Konzentration vor (Verhaar et al., 1993) und nur in seltensten Fällen sind deren Wirkungsmechanismen bekannt und spezifisch. Einer Studie der *US-EPA (Environmental Protection Agency)* zufolge sind für nur 50 % der Chemikalien mit hohem Produktionsvolumen relevante Prüfdaten zu akut toxischen Wirkungen bekannt. Für andere Bereiche wie chronische Toxizität, Teratogenität, Mutagenität, Ökotoxizität oder Umweltverbleib liegt der Anteil verfügbarer Daten bei durchschnittlich ca. 20 % (Schüürmann et al., 1999).

In der aquatischen Toxikologie leisteten Könemann und Hermens Pionierarbeit zur Vorhersage und Beurteilung von Mischungen aus Substanzen, deren Wirkungsmechanismen unklar oder unbekannt sind. Sie untersuchten eine Vielzahl von Mischungen aus nicht-ionisierten, organischen Chemikalien (Könemann, 1981, Hermens et al., 1984a, 1985b, 1985a), Chlorphenolen (Könemann und Musch, 1981), Chlor- und Alkylanilinen (Hermens et al., 1984c), und reaktiven, organischen, halogenierten Substanzen (Hermens et al., 1985c), hauptsächlich unter Verwendung von Fisch- und Daphnienassays. Ihr Rational bestand darin, daß eine quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung ("quantitative structure-activity relationship" – kurz *QSAR*) für eine Gruppe von Chemikalien Indikator für einen ähnlichen Wirkungsmechanismus dieser Substanzen sein könnte (Hermens et al., 1985b). Als Kombinationswirkung von Mischungen aus solchen Substanzen erwarteten sie Konzentrationsadditivität (Hermens et al., 1984a). Zusätzlich wurden Mischungen aus Substanzen mit unterschiedlichen Strukturen und antizipierten unähnlichen Wirkungsmechanismen durchgeführt (Hermens und Leeuwangh, 1982, Hermens et al., 1984 b). In einer späteren Studie wurden *QSARs* verwendet um Gruppen von Chemikalien mit unähnlichen Wirkungsmechanismen zu unterscheiden (Hermens et al., 1985c). In allen Experimenten waren die beobachteten Kombinationswirkungen konzentrationsadditiv oder teilweise konzentrationsadditiv, d. h. weniger als additiv. Allerdings wurden jegliche Mischungstoxizitätsergebnisse ausschließlich mit nach *KONZENTRATIONSADDITIVITÄT* berechneten Erwartungen verglichen. Vorhersagen der Mischungstoxizität nach *UNABHÄNGIGER WIRKUNG* wurden nicht kalkuliert. Diese Ergebnisse wurden als Evidenz dafür gewertet, daß *KONZENTRATIONSADDITIVITÄT* als Model zur Vorhersage der Toxizität von Chemikaliengemischen verwendet werden kann, unabhängig von den Wirkungsmechanismen der Komponenten (van Leeuwen, 1991). Für Mischungen aus

Chemikalien, wie sie für die Umwelt typisch sein könnten, d. h. mit unähnlichen Strukturen und unklaren oder unbekanntem Wirkungsmechanismen, ist es weiter ungeklärt, ob KONZENTRATIONSADDITIVITÄT als alleiniges Konzept zur Vorhersage und Beurteilung der Mischungstoxizität gilt.

#### MILIEUFAKTOREN

Doch nicht nur die mangelnden Informationen über die Wirkungsmechanismen der Chemikalien erschweren die Analyse ihrer Kombinationswirkungen. Hinzu kommen biotische und abiotische Faktoren, die die Toxizität von Einzelstoffen und Stoffgemischen verändern können (Sprague, 1985). Dies ist nicht nur für Toxizitätsstudien unter Freilandbedingungen von Bedeutung, wo solche Toxizitätsmodifizierenden Faktoren erheblich variieren können, sondern ebenso für Untersuchungen unter Laborbedingungen. Bei der Ermittlung der Toxizität von Einzelstoffen und Stoffgemischen wird für gewöhnlich nur eine Größe variiert - die Substanzkonzentration oder -dosis -, während die Variation anderer Testvariablen entweder möglichst eliminiert, in einem angegebenen Rahmen konstant gehalten oder nicht bekannt ist. Ein wesentlicher Bestandteil der Kombinations-Wirkungs-Analyse ist die Berechnung einer Toxizitätserwartung, die auf den Toxizitätsdaten der Einzelstoffe basiert (vgl. Kapitel 2.4.1).

Für die Interpretation einer beobachteten Kombinationswirkung ist daher die Kenntnis über Art und Größe des Einflusses der die Toxizität der Einzelstoffe und der Mischung modifizierenden Faktoren von Bedeutung. Modifizierende Faktoren können jegliche Merkmale des untersuchten Organismus oder des ihn umgebenden Milieus sein, welche die Toxizität eines Schadstoffes beeinträchtigen. Beispiele für biotische Faktoren sind der Organismustyp, das Lebensstadium, der Ernährungszustand und die Gesundheit oder saisonale Veränderungen des physiologischen Status. Die Vielfalt der physikochemischen Parameter des den Organismus umgebenden Milieus ergeben typische Beispiele für abiotische Faktoren. Dazu zählen primär Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff- bzw. Kohlendioxidgehalt, Salzgehalt oder Wasserhärte. Obwohl abiotische Faktoren auch direkt auf Organismen einwirken können, z. B. hohe Temperaturen als letaler Faktor, haben sie in vielen Fällen einen rein chemischen Einfluß auf die toxische Substanz im Milieu, wie z. B. der pH-Wert auf die Speziation von Metallen. Untersuchungen zum Einfluß abiotischer Faktoren auf die Toxizität wurden bisher vorwiegend für Einzelsubstanzen durchgeführt. Beispielsweise ist für Zink der Einfluß der Wassertemperatur auf die Toxizität gegenüber Lachsen gezeigt worden (Hodson und Sprague, 1975). Auch für Pestizide wie z. B. Endrin

(Johnson, 1968) oder Pentachlorphenol (Asano et al, 1969) wurde gleiches demonstriert. In anderen Untersuchungen wurde der Einfluß der Wasserhärte auf die Toxizität von Petrochemikalien (Pickering und Henderson, 1966) und auf Pestizide für Fische (Slonin, 1977; Marking und Bills, 1976) quantifiziert. Studien mit Ammonium an Fischen sind klassische Beispiele für die pH-Wert-abhängige Toxizität von einzelnen Chemikalien (Alabaster und Lloyd, 1980). Auch für Chlorphenole (Kishino und Kobayashi, 1995; Schüürmann, 1998; Holcombe et al., 1980; Escher et al., 1999; Könemann und Musch, 1981), Zyanid (Broderius et al., 1977; Doudoroff et al., 1966), Sulfit (Sano, 1976), Nitrit (Russo et al., 1981) und Malathion (Bender, 1969) wurde der pH-Wert als ein die Toxizität von Einzelsubstanzen modifizierender Faktor in verschiedenen Organismen beschrieben. Für Stoffgemische ist zwar deren pH-Wert-abhängige Toxizität für Abwässer in Fischen beschrieben worden (McLeay et al., 1979). Die Bedeutung des Einflusses der pH-Wert-abhängigen Toxizität von Komponenten einer Mischung für die Vorhersage und Beurteilung ihrer Kombinationswirkung ist bislang allerdings nicht geklärt.

Als *Ursache* der pH-Wert-abhängigen Einzelstofftoxizität wird beispielsweise für Malathion die Umwandlung in toxischere Produkte infolge Hydrolyse (Bender, 1969) diskutiert. Auch eine veränderte Reaktivität von Organismen infolge des pH-bestimmten Milieus ist gezeigt worden (Kugel, 1988). In nicht seltenen Fällen wird die Ursache der pH-Wert-abhängigen Toxizität von Substanzen im Zusammenhang mit deren Speziation diskutiert und auf die alleinige Wirksamkeit der undissoziierten Spezies zurückgeführt (Könemann und Musch, 1981; Fahl et al., 1995; Kishino und Kobayashi, 1995). Aber auch ein Beitrag der ionisierten Form zur Geamttoxizität eines solchen binären Gemisches wird nicht ausgeschlossen (Schüürmann, 1998; Saarikoski und Viluksela, 1981). Auch die zusätzliche Beteiligung eines Heterodimers aus beiden genannten Substanzformen an kinetischen Prozessen an und innerhalb von Targetmembranen wird bei mechanistischen Analysen in Betracht gezogen (Escher et al., 1999). In Abhängigkeit des pH-Wertes dissoziierbare Substanzen stellen nicht bloß Einzelsubstanzen dar, sondern können selbst als Mischungen aus verschiedenen Substanzformen betrachtet werden, deren Kombinationswirkung zur beobachteten Toxizität der Einzelsubstanz führt. Ein binäres Gemisch aus ionogenen Substanzen könnte folglich auch als multiple Mischung aus verschiedenen Formen der Einzelsubstanzen verstanden werden, mit verschiedenen Arten des Zusammenwirkens der Substanzformen. Ein besseres Verständnis des Zusammenwirkens der Formen solch ionogener Substanzen könnte daher die Interpretation von Kombinationswirkungen von Chemikaliengemischen unter Beteiligung ionogener Substanzen verbessern helfen.

## NIEDRIGE EFFEKTKONZENTRATIONEN

Die Bewertung des Risikos oder der Gefährdung von Chemikalien für die Umwelt basiert bislang fast ausschließlich auf der Toxizitätsbeurteilung einzelner Substanzen und der Vorstellung, eine Konzentration angeben zu können, ab der die Substanz im exponierten Organismus keinen Effekt mehr auslöst (EIFAC, 1987). In der Regel liegen im Freiland aber nicht nur einzelne Chemikalien vor, sondern wirken mehrere Chemikalien in geringen Konzentrationen gleichzeitig oder nacheinander auf den exponierten Organismus ein (Yang et al., 1998). In der Frage der Risikobeurteilung von Chemikaliengemischen, deren Komponenten in so niedrigen Konzentrationen vorliegen, in denen sie als Einzelstoff keinen beobachtbaren Effekt mehr generieren, kommen die konkurrierenden Konzepte zur Vorhersage von Kombinationswirkungen, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, zusätzlich zu völlig unterschiedlichen Einschätzungen. Eine 'No observed Effect Concentration' (NOEC) wird als die höchste, getestete Konzentration definiert, bei der der beobachtete Toxizitätsparameter statistisch noch nicht signifikant vom Kontrollwert abweicht (Van Leeuwen und Hermens, 1995; Van Hoeven et al., 1997). Unter der Annahme konzentrationsadditiven Zusammenwirkens ähnlich wirkender Substanzen trägt jede Komponente mit der Konzentration, in der sie in der Mischung vorliegt, zur Gesamtoxizität bei, unabhängig davon, wie niedrig die Konzentration auch sein mag. Denn in die Berechnung der Toxizitätsprognose nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT fließen ausschließlich Konzentrationen ein (vgl. Gl. 8). Im Gegensatz zur UNABHÄNGIGEN WIRKUNG, das zur Kalkulation der Mischungstoxizität unähnlich wirkender Substanzen Effekte berücksichtigt (vgl. Gl. 4). Das bedeutet, wenn die Komponenten eines Gemisches in Konzentrationen vorliegen, in denen sie einzeln keine Effekte mehr auslösen, dann ist auch für die Mischung kein Effekt mehr zu erwarten (Grimme et al., 1996b).

Für Mischungen aus ähnlich wirkenden Chemikalien besteht weitgehend Konsens darüber, daß individuelle Grenzwerte keine Relevanz besitzen, was experimentell auch schon gezeigt werden konnte (Grimme et al. 1998, Backhaus, 2000). Für Mischungen aus unähnlich wirkenden Substanzen besteht hingegen die häufig geäußerte Ansicht, daß sie keinen Effekt erzeugen, wenn ihre Komponenten in Konzentrationen vorliegen, die individuellen Grenzwerten in Form der NOEC entsprechen (Henschler et al., 1996; Jonker et al., 1996; Feron et al., 1998; Cassee et al., 1998; Streffer et al., 2000). Hinzu kommt, daß einige Autoren das Vorkommen von ähnlichen Wirkungsmechanismen für die Ausnahme halten und unähnliche Wirkungsmechanismen als die Regel für Freilandmischungen postulieren (Streffer et al., 2000; Pösch, 1993). Das nährt die Vorstellung, erstens, daß die bestehenden Grenzwerte auch für Stoffgemische sinnvoll und sicher seien und zweitens, daß Mischungen

aus Umweltchemikalien in niedrigen Konzentrationen keine Bedeutung besäßen. Experimentelle Evidenzen gibt es dafür allerdings bislang wenig.

### NOEC / BENCHMARKKONZENTRATIONEN

Ermittelt wird die NOEC mittels varianzanalytischer Verfahren, wie z. B. dem *DUNNETT-Test* (1955), weshalb die NOEC immer einer der getesteten Konzentrationen entspricht. Folglich ist die NOEC immer auch vom experimentellen Design abhängig. Auf der Basis einer hohen Anzahl von Testkonzentrationen in geringer Abstufung wird z. B. eine relativ niedrige NOEC ermittelt. Für dieselbe Substanz könnte aber auch ein weitaus höherer Wert berechnet werden, wenn in einem anderen experimentellen Ansatz die Anzahl der Testkonzentrationen wesentlich geringer und ihre Abstufung wesentlich größer gewählt worden wären. Zusätzlich zum experimentellen Design ist die NOEC aber auch von der Datenqualität für die betreffende Substanz abhängig (Hoekstra und Van Ewijk, 1993). Bei hoher Effektvarianz detektiert der statistische Test erst für höhere Konzentrationen einen Unterschied zwischen Probe und Kontrolle. Bei geringer Varianz der Effektdaten hingegen kann ein Unterschied aber schon für eine vergleichsweise niedrigere Testkonzentration festgestellt werden. Der resultierende niedrigere NOEC-Wert beschreibt die Substanz als toxischer im Vergleich zur NOEC, die bei einer höheren Effektvarianz ermittelt wurde (Laskowski, 1995; Chapman et al., 1996; Hoeven, 1997). Diese Kritikpunkte an der NOEC führten zum alternativen Konzept der Benchmarkkonzentration (Crump, 1984, 1995). Diese entspricht einer bestimmten Konzentration, bei der ein geringer aber definierter Effekt von gesetztem  $x\%$  erwartet wird. Solche Effektkonzentrationen werden aufgrund der experimentell ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Daten mit Hilfe biometrischer Modelle geschätzt. Daher ist der  $EC(x)$  nicht nur von der Quantität sowie Qualität der zugrunde liegenden Toxizitätsdaten abhängig, sondern außerdem davon, wie gut die experimentellen Daten von den verwendeten biometrischen Modellen beschrieben werden. Da die zur Beschreibung des Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhanges verwendeten biometrischen Modelle keine *No Effect Level* vorgeben, wird üblicherweise ein Effektleve zwischen  $1\%$  und  $10\%$  definiert (Auton, 1994; Crump, 1995). Die Vorteile in der Verwendung von  $EC(x)$  zur Risikoabschätzung gegenüber NOEC liegen hauptsächlich in der Möglichkeit, deren Unsicherheit in Form von Konfidenzintervallen quantitativ beschreiben zu können. Außerdem können  $EC(x)$  in beiden Konzepten, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, problemlos für die Berechnung einer zu erwartenden Mischungstoxizität verwendet werden.

## 1.7 Fragestellungen der Arbeit

Aquatische Organismen sind in der Regel nicht einzelnen Chemikalien gegenüber exponiert, sondern einer Vielzahl von heterogenen Substanzen gleichzeitig oder nacheinander ausgesetzt. Für den Großteil von Umweltchemikalien liegen zusätzlich kaum Informationen über Quelle, Konzentration, Wirksamkeit oder Wirkungsmechanismus der Stoffe vor. Die Anwendbarkeit der Kombinations-Wirkungs-Analyse zur Vorhersage und Beurteilung von Chemikaliengemischen setzt aber nach bisherigem Erkenntnisstand eine Einteilung in unähnlich und ähnlich wirkende Substanzen voraus. Für Chemikalien, deren Wirkungsmechanismen unbekannt sind, kann diese Voraussetzung nicht erfüllt werden. Aus den Ergebnissen bisheriger Studien mit Mischungen aus Substanzen mit heterogenen Strukturen und unklaren oder unbekanntem Wirkungsmechanismen, ergeben sich Hinweise, daß deren Mischungstoxizität, unabhängig von ihren Wirkungsmechanismen, mit KONZENTRATIONSADDITIVITÄT vorhergesagt werden kann.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Vorhersagbarkeit der Toxizität einer Mischung, die einer "realen-Welt-Situation" (*real world situation*, Henschler et al., 1996) ähnelt, d. h. einer Mischung aus Substanzen mit heterogenen Strukturen und größtenteils unbekanntem Wirkungsmechanismen. Im Unterschied zu bisherigen Untersuchungen soll die beobachtete Mischungstoxizität mit den Vorhersagen beider Konzepte, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, verglichen werden.

Faktoren, die die Toxizität von Einzelstoffen und Mischungen verändern können, sind im Freiland sowie in Laboruntersuchungen von Bedeutung. Biotische und abiotische Faktoren sind Gegenstand zahlreicher Studien, in denen deren modifizierender Einfluß auf die Toxizität von Einzelsubstanzen demonstriert und teilweise auch Ursachen untersucht wurden. Welche Bedeutung der Einfluß der pH-Wert-abhängigen Toxizität von Komponenten einer Mischung für die Vorhersage und Beurteilung ihrer Kombinationswirkung hat, ist bislang allerdings unklar und auch nicht untersucht. In dieser Arbeit wurde exemplarisch der pH-Wert als Milieufaktor ausgewählt und sein Einfluß auf die Vorhersage und Beurteilung der Toxizität einer heterogenen Mischung aus Umweltchemikalien untersucht. Zusätzlich wurden Untersuchungen zu möglichen Ursachen pH-Wert-abhängiger Toxizität von ionogenen Substanzen durchgeführt.

Die Bewertung des Risikos oder der Gefährdung von Chemikalien für die Umwelt basiert bislang ausschließlich auf der Toxizitätsbeurteilung einzelner Substanzen und der Vorstellung, eine Konzentration angeben zu können, ab der die Substanz im exponierten Organismus keinen schädlichen Effekt mehr auslöst. In der Frage der Risikobeurteilung von

Chemikaliengemischen, deren Komponenten in so niedrigen Konzentrationen vorliegen, in denen sie als Einzelstoff keinen Effekt ("no effect concentration" – kurz *NEC*) mehr generieren, kommen die konkurrierenden Konzepte zur Vorhersage von Kombinationswirkungen, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, zusätzlich zu völlig unterschiedlichen Bewertungen. Unter Annahme unabhängigen Zusammenwirkens der Mischungskomponenten wäre auch für die Mischung kein Effekt mehr zu erwarten. Die Einschätzung, das im Freiland Mischungen überwiegend aus Substanzen mit unähnlicher Wirkung vorliegen, legt die Schlußfolgerung nahe, daß für Mischungen aus Umweltchemikalien in niedrigen Konzentrationen prinzipiell keine Gefahr besteht. Zur Klärung der Frage, ob derartige Mischungen noch signifikante Toxizitäten erzeugen vermögen, wurde für eine Mischung aus Umweltchemikalien mit größtenteils unbekanntem Wirkungsmechanismus das Auftreten einer Kombinationswirkung untersucht, wenn die Komponenten in Konzentrationen vorliegen, die gleich oder kleiner ihrer individuellen, statistisch bestimmten Wirkschwellen (NOEC) sind.

# 2 Material & Methoden



---

## 2 Material und Methoden

Zur Untersuchung der Kombinationswirkung einer multiplen Mischung wurden verschiedene Methoden verwendet, die im Folgenden beschrieben werden. Neben einem Algentest zur Ermittlung der Toxizität der untersuchten Substanzen und Stoffgemische (Kapitel 2.1) und dem Verfahren zur Selektion der Komponenten, die die untersuchte Mischung bilden (Kapitel 2.2), gehört dazu ferner die Analyse der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe und Mischungen (Kapitel 2.3) sowie die Vorgehensweise bei der Analyse der Kombinationswirkung von Mischungen aus Chemikalien (Kapitel 2.4).

### 2.1 Algentoxizitätstest

Die Ermittlung der Toxizität von Substanzen mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften sowie die statistisch valide Schätzung von Effekten von 1 % stellt spezielle Anforderungen an die Datenqualität sowie -quantität und damit auch an den verwendeten Biotest. Der verwendete Algenbiotest sollte daher eine hohe Testkapazität aufweisen bei gleichzeitig minimierter biologischer Varianz und maximierter Reproduzierbarkeit der Effektdaten. Außerdem sollte ein physikochemisch breites Substanzspektrum testbar sein. Die Verwendung eines Toxizitätsparameters auf einer integralen Ebene biologischer Organisation ermöglicht, die von verschiedenen Substanzen mit unterschiedlichen Wirkungsweisen erzeugten Wirkungsintensitäten in einem gemeinsamen Endpunkt zu erfassen. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für die Untersuchung der Vorhersagbarkeit der Toxizität einer Mischung aus Substanzen mit größtenteils unbekanntem Wirkungsmechanismen. Denn ohne die Möglichkeit Effekte zu erfassen, die von Substanzen mit verschiedenen Wirkungsmechanismen erzeugt werden, wäre die Detektion von Kombinationseffekten von Substanzen mit unähnlichen Wirkungsmechanismen per se ausgeschlossen. Folglich wäre auch eine Beurteilung der Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität nach dem Konzept der UNABHÄNGIGER WIRKUNG nicht möglich.

Um die Wirksamkeit der Einzelsubstanzen und der Mischung zu überprüfen, wurde ein optimierter 24-Stunden-Eingenerationen-Algentest (Faust et al., 1992) mit synchronisierten Flüssigkulturen der einzelligen Grünalge *Scenedesmus vacuolatus* als Testorganismus und der Hemmung der Reproduktion als Toxizitätsparameter verwendet.

## TESTORGANISMUS UND KULTURBEDINGUNGEN

Flüssigkulturen von *Scenedesmus vacuolatus* (früher *Chlorella fusca* var. *vacuolata*) Shih. et Krauss, Stamm 211-15, Kultursammlung Pringsheim (Göttingen, BRD), wurden photoautotroph bei  $28 \pm 0,5$  °C in einem in Tab. 1 näher spezifizierten Medium kultiviert.

Tab. 1: Nährstoffkonzentrationen im Algenmedium (modifiziert nach Grimme und Boardmann, 1972 und Altenburger et al., 1990).

<b>Makroelemente</b>	<b>Konzentration [mM]</b>	<b>Mikroelemente</b>	<b>Konzentration [µM]</b>
NaCl	8,0	CaCl * 2H <sub>2</sub> O	100
KNO <sub>3</sub>	8,0	MnCl * 4H <sub>2</sub> O	2,5
Mg SO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	1,0	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	8,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	1,0	Fe-EDTA-Komplex	24,8
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	3,0	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,016
		ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,7

Als Kohlenstoffquelle diente Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>, welches bei Testbeginn in einer für die Algenvermehrung optimalen Endkonzentration von 1,86 mmol/L (Abb. 2) appliziert wurde. Als Kulturgefäße wurden Rundbodengläser (PYREX, England) mit Schraubverschluß und Teflon beschichteten Dichtungen mit einem Nennvolumen von 10 mL verwendet. Als Kulturvolumen wurden 8 mL eingesetzt. Ein Magnetrührstab am Boden der Gefäße hielt die Algen durch Rühren für 30 Sekunden in Abständen von 4 Minuten in Suspension. Die Versorgung der Algen mit Licht wurde gewährleistet durch die Verwendung von zwei Lampentypen (Osram L36W/41 Interna und Osram L36W/11 Daylight, Osram, Berlin, BRD), die eine Intensität von 13-18 W/m<sup>2</sup> (22-33 klux) und eine Photonenfluxdichte von 370 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> an der Oberfläche der Gefäße erzeugen. Das verwendete Phosphatpuffersystem begrenzt den durch die Assimilation von Nitrat bewirkten pH-Wert-Anstieg über die Testdauer von zu Beginn pH 6,7 auf 0,2 Einheiten, so daß über die Testdauer ein pH-Wert von 6,9 +/- 0,2 Einheiten vorliegt. Die Animpfdichte beträgt zwischen  $7 - 9,5 \cdot 10^4$  Zellen und zeigte keinen Einfluß auf die Konstanz des pH-Wertes über die Testdauer (Abb. 3).

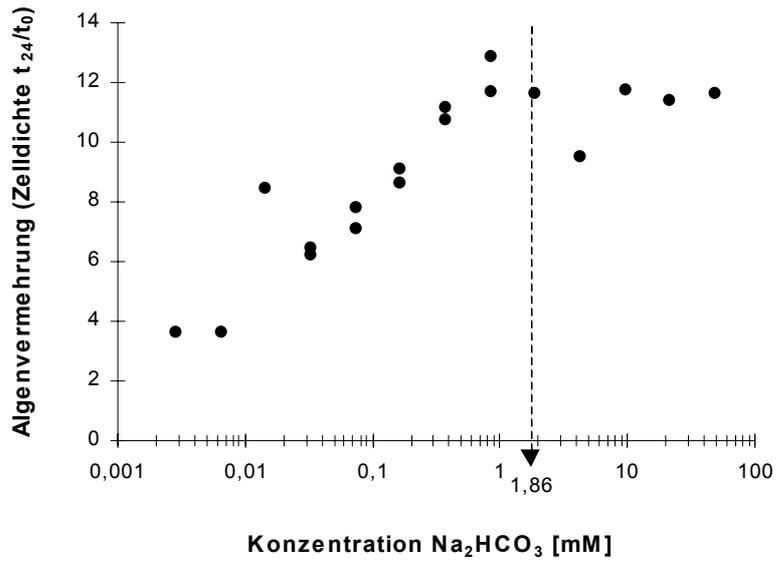


Abb. 2: Einfluß der Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>-Konzentration auf die Algenvermehrung. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Vermehrung bei der im Algentest verwendeten Konzentration von 1,86 mmol/L.

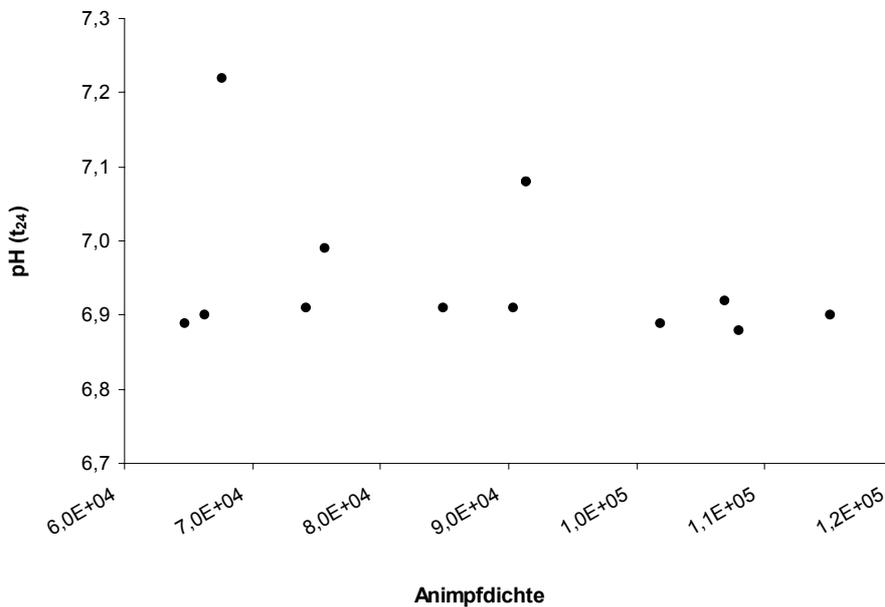


Abb. 3: Einfluß der Animpfdichte auf die pH-Konstanz über die Testdauer (24h). Trotz zunehmender Inokulumdichte bleibt der pH-Wert am Ende des Standardzyklus (t<sub>24</sub>) konstant bei pH 6,9.

## WACHSTUMSZYKLUS UND ALGENVERMEHRUNG

Die synchronisierten Algenzellen wachsen während einer 14-stündigen Lichtphase, durchlaufen dann während der anschließenden 10-stündigen Dunkelphase sukzessive 3 bis 4 Replikations- und Teilungsphasen und setzen am Ende des Generationszyklus nach 24 Stunden  $2^n$  Autosporen ( $n = 3 - 4$  Replikations- und Teilungsphasen) pro Mutterzelle frei. Dabei bilden unbehandelte Mutterzellen 8 oder 16 Autosporen, was einer Vermehrung um den Faktor 12 entspricht.

Untersuchungen zur pH-Wert-abhängigen Algenvermehrung ergaben eine geringere Vermehrung bei zunehmend alkalischen Milieubedingungen (Abb. 4). Obwohl die Grenze für die Auflösung von geringen Effekten mit abnehmender Vermehrung sinkt, wird eine Vermehrung größer Faktor 4 für die Ermittlung von mittleren Hemmkonzentrationen (z. B. EC50) als ausreichend betrachtet. Die Größe der Animpfdichte hat insofern einen erkennbaren Einfluß auf die Algenvermehrung, als diese mit steigender Inokulumdichte abnimmt (Abb. 5). Für die verwendeten Animpfdichten wird allerdings eine fast maximierte Vermehrung um den Faktor 11-12 erzielt.

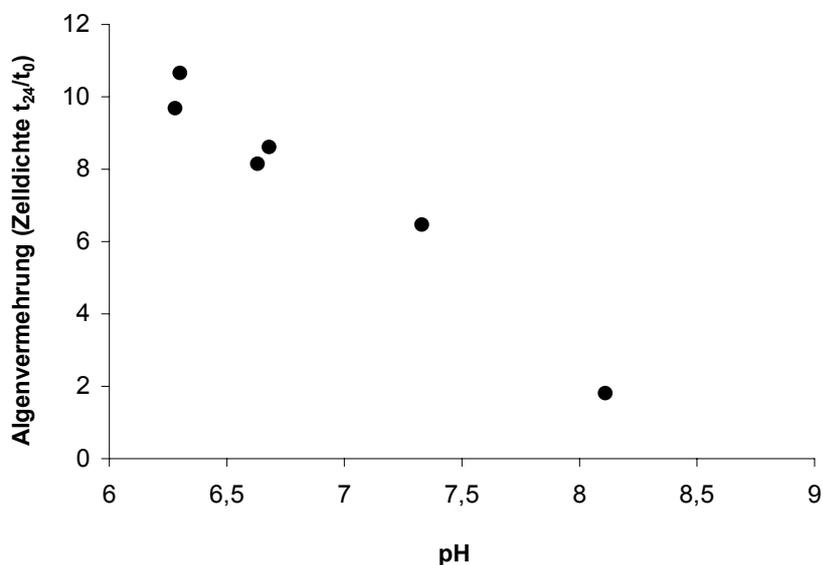


Abb. 4: Einfluß des pH-Wertes auf die Algenvermehrung. Algenvermehrung und pH-Wert zeigen deutlich eine negative Korrelation: mit zunehmenden pH-Wert nimmt die Vermehrung der Algenzellen ab.

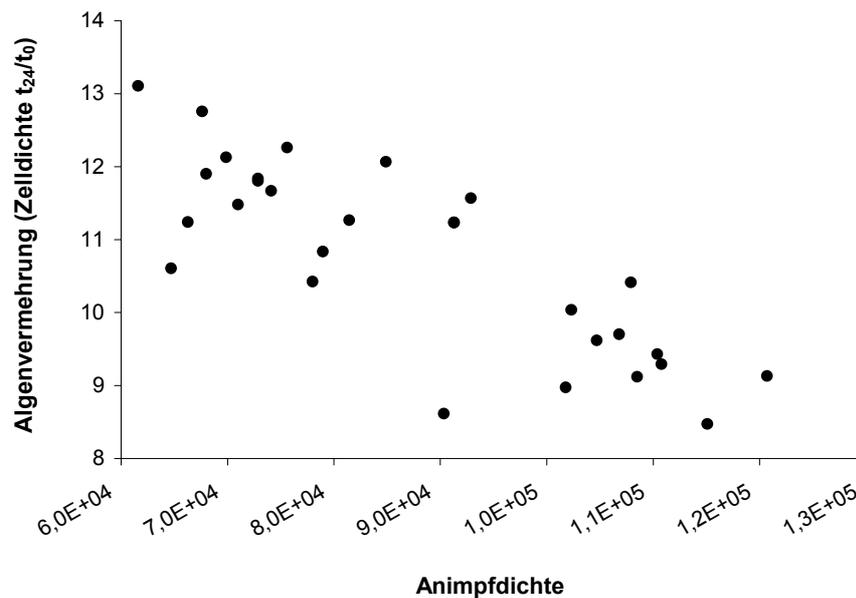


Abb. 5: Einfluß der Animpfdichte auf die Algenvermehrung. Mit zunehmender Dichte der Algen zu Beginn des Wachstumszyklus ( $t_0$ ) wird an dessen Ende ( $t_{24}$ ) eine geringere Algenvermehrung beobachtet.

#### SYNCHRONISATION

Zur weitgehenden Standardisierung des Versuchsmaterials werden die Flüssigkulturen mit einem Licht-Dunkel-Wechsel von 14:10 Stunden und einer periodischen Verdünnung auf eine Standard-Zelldichte vor Beginn der Lichtphase ( $t_0$ ) des Wachstumszyklus synchronisiert (Tamiya, 1966; Lorenzen, 1964). Die Synchronisation der Kultur wurde überprüft, indem die Homogenität der Autosporenpopulation als Zellgrößenverteilung zu  $t_0$  analysiert wurde.

#### WIRKSTOFFAPPLIKATION UND PROBENNAHME

Die Testsubstanzen wurden in Methanol (p. A., Merck) gelöst und als Stammlösungen bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Für die Testung der Wirksamkeit einer Substanz wurde ein Aliquot des organischen Lösungsmittels unter Stickstoff bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand in Kultivationsmedium aufgenommen und mindestens 14 Stunden gerührt. Für die Testung der Mischungstoxizität wurden aus diesen wäßrigen Stammlösungen die Gemische zusammengestellt. Die verdünnten Testsubstanzen oder ihr Gemisch wurden den Algenkulturen zu Beginn des Wachstumszyklus ( $t_0$ ) zugegeben, wobei das Verhältnis von

Testlösung zu Algensuspension 9:1 betrug. Am Ende des Standardzyklus ( $t_{24}$ ) wurden die Kulturen beprobt und die Zellzahl sowie die Zellvolumenverteilung bestimmt.

### BESTIMMUNG DER TESTPARAMETER UND DES TOXIZITÄTSENDPUNKTES

Zellzahl und Zellvolumenverteilung wurden mit Hilfe des Partikelzählgerätes CASY II (Schärfe System, Reutlingen) mit einer Kanüle, die eine Öffnung von 60  $\mu\text{m}$  im Durchmesser besitzt, ermittelt. Die Kalibrierung des Systems wurde mit Latex Partikeln einer definierten Größe (15,6 fl) überprüft. Unmittelbar nach Beginn und nach Beendigung des Experiments wurden den Kulturen Aliquots (500  $\mu\text{L}$ ) entnommen und diese 1:10 mit dem Elektrolyten CASYton (Schärfe System, Reutlingen) verdünnt und die Zellzahl bestimmt. Die gewählte Verdünnung gewährleistet 2500-15000 counts/200  $\mu\text{l}$  Probe. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte als Wiederholungsmessung von Doppelproben. Die Differenz der Meßwerte zu  $t_0$  und  $t_{24}$  ( $\Delta\text{CN} = \text{CN}_{t_{24}} - \text{CN}_{t_0}$ ) wurde auf die Vermehrungsdaten der Kontrollkulturen normalisiert und so die Inhibition der Algenreproduktion berechnet:

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

## 2.2 Auswahl der Mischungskomponenten

### ANFORDERUNGEN AN DIE MISCHUNGSKOMPONENTEN

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Kombinations-Wirkungs-Analyse einer Mischung, wie sie auch im Freiland vorliegen könnte, d. h. bestehend aus Substanzen mit heterogenen Strukturen und größtenteils unbekanntem Wirkungsmechanismus (vgl. Kapitel 1.7). Darüber hinaus müssen die Mischungskomponenten als analysenreine Substanzstandards kommerziell verfügbar sein. Eine weitere Anforderung an die auszuwählenden Substanzen war, daß analytische Verfahren zur Validierung der eingesetzten Testkonzentrationen und ihrer stofflichen Stabilität über die Versuchsdauer vorhanden sind. Da die Qualität der Kombinations-Wirkungs-Analyse erheblich von der Qualität der ermittelten Toxizitätsinformationen der Einzelstoffe abhängt (vgl. Kapitel 2.4.1), war eine wesentliche Anforderung die Möglichkeit, reproduzierbare und valide Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Einzelsubstanzen ermitteln zu können. Um die Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität für einen Konzentrationsbereich und für *mehrere* Effektebenen beurteilen zu können, soll die Mischungstoxizität nach beiden Konzepten, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG, in Form einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung vorhergesagt werden. Um die Mischungstoxizität für einen möglichst großen Effektbereich von kleiner 1% bis 80% Effekt zu prognostizieren, ist es erforderlich, daß die Komponenten der Mischung als Einzelsubstanzen bei im Testmedium noch löslichen Konzentrationen mindestens 80 % Effekt generieren (vgl. Kapitel 1.4).

### VERFAHREN ZUR AUSWAHL DER MISCHUNGSKOMPONENTEN

Aus insgesamt 186 Chemikalien einer EG-Prioritätsliste wurden die Mischungskomponenten mit aus ökotoxikologischer Sicht vorrangiger Bedeutung nach Kriterien ausgewählt, die sich an den genannten Anforderungen orientieren. Die EG-Prioritätsliste „Liste 1“ (EEC List 1, Council Directive 76/464/EEC; CSTE/EEC, 1994), deren Substanzen aufgrund von Toxizität, Persistenz, Bioakkumulation und toxikologischer Relevanz für die aquatische Umwelt ausgewählt wurden, bildete den Chemikalien-*Pool* für die Selektion der Mischungskomponenten. Grundlage dieser Prioritätsliste ist die Council Directive 76/464/EEC, die den Rahmen für die rechtliche Regelung dieser Chemikalien in der aquatischen Umwelt festlegt. Die auf 129 Positionen aufgeführten Chemikalien dieser Liste sind ein Vorschlag der Kommission an den Council of Ministers. Dabei wird die Kommission

vom Wissenschaftlichen Komitee zur Toxizität und Ökotoxizität von Chemikalien (CSTE) beraten. Für die genehmigten Chemikalien der Liste 1 müssen vom Council Folge-Direktiven erlassen werden, die dann letztendlich die Emission der Chemikalien aufgrund von z. B. Wasserqualitätszielen regelt.

Ausgehend von den 129 Positionen auf der Liste 1, die teilweise mehrere Chemikalien gemeinsam aufführen (z. B. Position 100 Parathion including Methyl-Parathion; Position 122 Trichlorphenole [2,4,5- & 2,4,6-]; Position 101 PCB) oder als „Supplement Number“ Chemikalien auflisten (z. B. Flucofenuron) oder auch auf Isomere verweisen und diese einschließen (Position 85 Hexachlorocyclohexan), wurden 186 Chemikalien, denen eine CAS Nummer zugewiesen werden konnte, identifiziert. Aus diesen 186 Chemikalien wurden mittels eines chemometrischen Ansatzes unter Anwendung von Cluster- und Hauptkomponentenanalyse 20 Gruppen jeweils strukturell ähnlicher Chemikalien gebildet, wobei die Gruppen gegeneinander durch strukturelle Unähnlichkeit charakterisiert sind. Für die Selektion strukturunähnlicher Chemikalien wurden im weiteren Verfahren Repräsentanten dieser 20 Gruppen ausgewählt. Dieses Verfahren ist von den italienischen Kollegen Vighi (Milano), Gramatica (Varese) und Consolaro (Varese) durchgeführt worden, weshalb an dieser Stelle darauf nicht näher eingegangen wird. Methodische Details sind an anderer Stelle veröffentlicht (Gramatica et al., 2001, Gramatica und Consolaro, 1999, Walter et al., accepted). Ausschlusskriterien in einem anschließenden Selektionsschritt waren primär physikochemische Eigenschaften der Substanzen, die Probleme bei der Bestimmung ihrer Toxizität erwarten ließen, wie z. B. starke Hydrophobizität mit vermutlich resultierenden adsorptiven Eigenschaften, extreme Flüchtigkeit, bekannte thermische, photolytische, hydrolytische Instabilitäten und Biotransformationspotentiale sowie keine kommerzielle Erwerbbarkeit mit mindestens 95%-iger Reinheit. Ausgeschlossen werden sollten ferner Chemikalien, die bei maximaler Wasserlöslichkeit nicht mindestens 80 % Effekt erzeugen. Eine Operationalisierung dieses Kriteriums erfolgte über die Bildung eines Verhältnisses von Wasserlöslichkeit und einer Minimumtoxizität, die mit Hilfe einer quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung (Quantitative Structure Activity Relationship, QSAR) geschätzt wurde. Für QSAR Studien werden üblicherweise ein oder mehrere Deskriptoren der chemischen Struktur oder der physikochemischen Eigenschaften einer Reihe homologer Substanzen mit ihrer Toxizität in Form eines selektierten Endpunktes in einem bestimmten Testsystem korreliert. Dabei wird die Intensität beider Parameter logarithmisch dargestellt. Anschließend wird die Beziehung der Parameter regressionsanalytisch modelliert und kann so quantitativ beschrieben werden. In solchen QSAR Untersuchungen wird der  $\log K_{ow}$ , als Deskriptor lipophiler Eigenschaft, typischerweise verwendet um eine Minimumtoxizität zu modellieren (Lipnick, 1995) (vgl. Kapitel 3.1.3). Die mechanistische Grundlage dieser unspezifischen

Wirkung nicht-reaktiver, nicht-elektrolyter, organischer Verbindungen, auch als Narkose bezeichnet, ist bisher noch unverstanden. Nach der Lipoid-Theorie von Overton ist die Höhe des narkotischen Effektes gebunden an das Erreichen einer kritischen molaren Konzentration oder eines molaren Volumens einer Substanz im lipoiden Wirkort, also in Biomembranen (Lipnick et al., 1987). In Abwesenheit jeglicher spezifischer, reaktiver Mechanismen, wie sie zum Beispiel Substanz-Rezeptor Interaktionen darstellen, ist eine Chemikalie daher immer mindestens so toxisch wie aufgrund ihrer Lipophilie zu erwarten ist (Verhaar et al., 1992). Eine solche QSAR wurde für 7 Alkohole mit unpolar narkotischer Wirkung erstellt, für die folgende Regression ermittelt wurde:

$$\log EC50 \text{ (mol/L)} = - 0,81 * \log K_{OW} - 0,87. \quad [\text{Gl. 5}]$$

Da dieselbe QSAR für Alkohole für Untersuchungen zur Wirkungsspezifität (Kapitel 3.1.3) der selektierten Einzelsubstanzen verwendet wurde, sind die für die Alkohole regressionsanalytisch geschätzten EC50-Werte und die dazu verwendeten Regressionsmodelle und –parameter sowie die stoffliche Identität der Substanzen in Tab. 14 und 15, Kapitel 3.1.3, aufgeführt.

Für alle 186 Chemikalien der 20 chemometrischen Gruppen wurde eine Minimumtoxizität berechnet und mit der Wasserlöslichkeit verglichen. Eine Wasserlöslichkeit, die nicht mindestens um den Faktor 10 über der geschätzten Effektkonzentration lag, führte zum Ausschluß der Chemikalie.

Nach Anwendung dieses Kriterienkatalogs werden von den 186 Chemikalien der EG-Prioritätsliste 40 Substanzen auf ihre Wirksamkeit und Stabilität im Algentest unter Verwendung eines reduzierten Testdesign (vgl. Kapitel 2.3.1) geprüft. Bei maximal löslichen Konzentrationen zeigten 29 Substanzen nicht reproduzierbare (z. B. Tributylzinnoxid), zu geringe (< 80 % wie z. B. Endrin mit ca. 20 %) oder keine Effekte (z. B. Tetrachlorbenzol) oder erwiesen sich als instabil unter den Testbedingungen über die Versuchsdauer (z. B. Chloressigsäure). Schließlich wurden 11 ökotoxikologisch relevante, aus chemometrischer Sicht strukturell unähnliche Chemikalien (Tab. 3) der Prioritätsliste Liste 1 als Komponenten der zu testenden multiplen Mischung selektiert (Tab. 2).

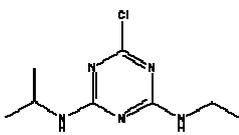
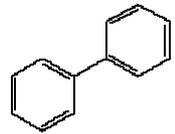
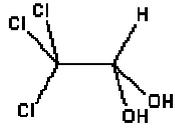
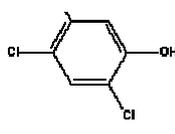
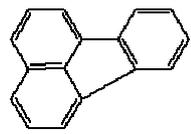
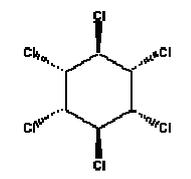
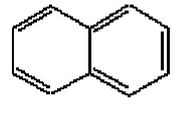
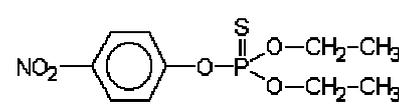
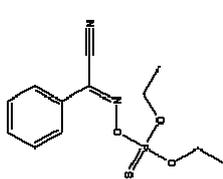
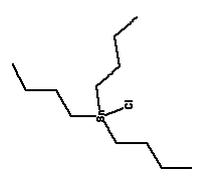
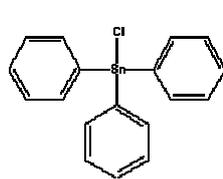
Tab. 2: Stoffliche Identität der selektierten Komponenten für die Untersuchung der multiplen Mischungstoxizitäten.

Nr.	Substanz	CAS-RN	Bezugsquelle	Charge	Reinheit [%]
1	Atrazin	1912-24-9	Riedel-de-Haen	20350	98
2	Biphenyl	92-52-4	Merck	S 16211810	99
3	Chloralhydrat	302-17-0	Merck	K 24366421 802	99
4	2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Riedel-de-Haen	30250	99
5	Fluoranthren	206-44-0	Aldrich	12301-058	98
6	Lindan	58-89-9	Dr. Ehrensdorfer	50621	99
7	Naphthalin	91-20-3	Aldrich	0309-038	99
8	Parathion	56-38-2	Dr. Ehrensdorfer	60729	99
9	Phoxim	14816-18-3	Riedel-de-Haen	62700	99
10	Tributylzinnchlorid	1461-22-9	Riedel-de-Haen	50230	96
11	Triphenylzinnchlorid	639-58-7	Merck	50886234	98

#### SONSTIGE CHEMIKALIEN

Alle übrigen Chemikalien wurden mindestens in p. A. Qualität von Merck, Fluka, oder Sigma-Aldrich bezogen.

Tab. 3: Strukturelle Einteilung der Komponenten der multiplen Mischung

Substanz	EG Liste 1	Chemometrische Gruppe <sup>1</sup>	Strukturformel
Atrazin	130suppl.	10	
Biphenyl	11	6	
Chloralhydrat	122	*	
2,4,5-Trichlorphenol	14	2	
Fluoranthren	[99]	15	
Lindan	85	8	
Naphthalin	96	3	
Parathion	100	12	
Phoxim	103	4	
Tributylzinnchlorid	115	18	
Triphenylzinnchlorid	126	17	

<sup>1</sup> nach Gramatica und Consolaro (1999).

\* ohne Gruppe



## 2.3 Konzentrations-Wirkungs-Analyse

Die *Genauigkeit* der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bezeichnet die Sicherheit, mit der eine ermittelte Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für eine Substanz in unabhängigen Versuchswiederholungen reproduziert werden kann. Für die Beurteilung der Vorhersagbarkeit der Toxizität eines Stoffgemisches ist die Genauigkeit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe von entscheidender Bedeutung. Denn um die Vorhersagbarkeit zu beurteilen, wird die beobachtete mit der berechneten Mischungstoxizität verglichen. Für diesen Schritt ist wesentliche Voraussetzung, daß die Substanzen die Wirkungsintensitäten, die sie bei den verwendeten nominalen Konzentrationen als Einzelstoff generieren, bei gleichen Konzentrationen ebenfalls als Komponente der Mischung erzeugen. Dies gilt insbesondere dann, wenn Vorhersagen aufgrund von so niedrigen Effekten wie 1% berechnet werden sollen (vgl. Kapitel 2.4.2 und 4.4). Sollen zusätzlich die ermittelten Toxizitäten der Einzelstoffe mit ihren Minimumtoxizitäten verglichen werden (vgl. Kapitel 3.1.3), mit dem Ziel, die Spezifität ihrer Wirkungsweisen einschätzen zu können, ist darüber hinaus bedeutend, daß die beobachteten Effekte validen Konzentrationen zugeordnet werden können. Eine solche *Richtigkeit* der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen und der Effektkonzentrationen ermöglicht ferner einen Vergleich der für die Substanzen beobachteten Toxizität mit Literaturwerten. Um eine möglichst hohe Genauigkeit und Richtigkeit der für die Einzelstoffe und die Mischungen ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen zu erreichen, sind verschiedene Schritte zur Qualitätssicherung unternommen worden. Die Analyse von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Einzelstoffen und Stoffgemischen setzt sich zusammen aus dem experimentellen Design zur Ermittlung der Wirkungsintensitäten (Kapitel 2.3.1), aus analytischen Verfahren zur Validierung der eingesetzten Konzentrationen und der Stabilität der Substanzen über die Testdauer (Kapitel 2.3.2) sowie aus biometrischen Verfahren zur Modellierung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen und zur Schätzung von Effektkonzentrationen (Kapitel 2.3.3).

### 2.3.1 Experimentelles Design

Als erstes wurde das Ansatzprozedere der wäßrigen Stammlösung in Abhängigkeit der physikochemischen Eigenschaften wie z. B. Löslichkeit, Flüchtigkeit oder Adsorptivität jeder Testsubstanz optimiert, mit dem Ziel, valide und reproduzierbare Konzentrationen einstellen zu können. Dies beinhaltete z. B. die Ermittlung des optimalen Volumenverhältnisses von abzdampfender organischer Stammlösung zu wäßriger Stammlösung, die Abstimmung von Rührkerngröße, Rührgeschwindigkeit und –dauer bei optimiertem Volumen zu Headspace-

Verhältnis, die Berücksichtigung von Temperatureffekten bei der Löslichkeit der Substanzen im Testmedium und die Ermittlung des Einflusses des Alters der Lösungen auf die Stabilität der Substanzen beispielsweise durch Abbauprozesse. Dazu wurden die nominalen Konzentrationen der wäßrigen Stammlösungen nach Aufbau eines geeigneten analytischen Verfahrens validiert (vgl. Kapitel 2.3.2 und 3.1.2).

Für die Ermittlung der Konzentrations-Effekt-Daten der Einzelstoffe und der Mischungen wurden geometrische Verdünnungsreihen mit einem jeweils an die Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung angepaßten Verdünnungsfaktor verwendet, was in einem ersten Schritt orientierende Versuche zur Bedingung hatte. Diese Versuche wurden mit einem reduzierten Testdesign durchgeführt. Die Anzahl der Testkonzentrationen (mindestens 6) wurde auch hier in Abhängigkeit von der Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung gewählt. In der Regel wurden die Daten in mehreren unabhängigen Versuchsansätzen mit jeweils 3 unbehandelten Kulturen als Kontrollen ermittelt. Die valide Beschreibung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zwischen 20 % und 80 % Effekt wurde bei diesen Versuchen zur Orientierung auf der Konzentrations- sowie Effektskala als ausreichend betrachtet. In einem 2. Schritt wurden die Toxizitätsdaten in parallelen Triplikaten aufgenommen, wobei jeweils mit 12 Konzentrationen in unabhängigen Versuchsansätzen der Bereich von < 1 % bis mindestens 80 % Effekt abgedeckt wurde. Je Triplikatansatz wurden üblicherweise 6 unbehandelte Kulturen als Kontrollen eingesetzt. Prinzipiell ist die experimentelle Herangehensweise für die Toxizitätstestung des multiplen Gemisches dasselbe wie für die Einzelstoffe beschrieben.

Für Substanzen, für die unter Verwendung einer EC50 als Kenngröße der Toxizität eine quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung (QSAR, vgl. Kapitel 3.1.3) ermittelt werden sollte, wurde ein reduziertes Testdesign verwendet, das dem entspricht, wie es für die orientierenden Versuche zur Ermittlung der Toxizität der Einzelstoffe oben beschrieben wurde.

Für die Charakterisierung der pH-Wert-abhängigen Toxizität der ionogenen Substanz 2,4,5-Trichlorphenol (vgl. Kapitel 3.3.1) und der Toxizitätstestung der Mischung unter veränderten pH-Bedingungen des Versuchsmediums (vgl. Kapitel 3.3.2) wurde der pH-Wert grundsätzlich über den Phosphat-Puffer des Algenmediums eingestellt. Bei einer für alle Versuche verwendeten Gesamtpufferkonzentration von 4 mol/L wurde das Verhältnis von primärem zu sekundärem Hydrogenphosphat entsprechend verändert. Zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Algenvermehrung (vgl. Kapitel 3.3.3) wurden teilweise *GOOD-buffer*

in einer Konzentration von 20 mmol/L verwendet: MES (pH 5,5 und 6,1), PIPES (pH 6,8), TRICINE (pH 8,1) und CHES (pH 9,3).

### 2.3.2 Validierung von Konzentrationen und Stabilität der Testsubstanzen

Zur Validierung der nominalen Konzentrationen der verwendeten wässrigen Stammlösungen, der eingesetzten Testkonzentrationen und der Stabilität der Substanzen über die Versuchsdauer wurden chromatographische Methoden wie *Hochdruckflüssigkeitschromatographie* (HPLC) und *Gaschromatographie* (GC) mit in Abhängigkeit von den Substanzen ausgewählten Detektionsverfahren eingesetzt. Die organischen Stammlösungen wurden als Eichstandards verwendet.

#### EINZELSTOFFE DER MULTIPLLEN MISCHUNG

Da die Nominalkonzentrationen der wässrigen Stammlösungen und die auf dieser Basis berechneten Testkonzentrationen der selektierten Substanzen aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften als unzuverlässig angesehen werden müssen (vgl. Kapitel 3.1.1), wurden Bezugsgrößen festgelegt. Vor Beginn der Toxizitätstestung der Einzelstoffe wurde die Nominalkonzentration der wässrigen Stammlösung analysiert (Tab. 4). Der Mittelwert der für die wässrige Stammlösung analysierten Konzentration bildete den Bezugspunkt für die Festlegung der Testkonzentrationen. Für die Validierung der so berechneten Testkonzentrationen der für die Mischung selektierten Einzelstoffe und die Untersuchung ihrer Stabilität hinsichtlich Hydrolyse, Photolyse und Metabolismus, wurde die jeweils höchste Testkonzentration zu Testbeginn ( $t_0$ ) und Testende ( $t_{24}$ ) analysiert (Tab. 4; vgl. Kapitel 3.1.2). Für die Analytik der  $t_0$ - und  $t_{24}$ -Konzentration der Einzelstoffe wurde die jeweils höchste Testkonzentration zusätzlich zur Testkonzentration des Algentests für die  $t_0$ - und  $t_{24}$ -Konzentrationsanalyse jeweils als Duplikat angesetzt. Vor Testbeginn wurden die Algen von 2 Testgefäßen abzentrifugiert und Aliquots in Duplikaten für die chemische Analytik entnommen. Bei flüchtigen Substanzen wurden speziell angefertigte Testgefäßdeckel verwendet, die mittig durchbohrt, bei intaktem 2-schichtigem Septum (aus Teflon und Gummi) die Entnahme des Aliquots mittels einer Glasspritze mit Edelstahlkapillare erlaubten. Die beiden Testgefäße zur Analyse der  $t_{24}$ -Konzentration wurden zusammen mit den Gefäßen des Algentests exponiert. Nach Ablauf der Testdauer wurden sie genauso behandelt wie für die Gefäße zur Analyse der  $t_0$ -Konzentration beschrieben. Als Positivkontrollen während der chemischen Analytik der Aliquots wurden 1-3

Verdünnungen der organischen Stammlösung verwendet. Die analysierte  $t_0$ -Konzentration führte dann zu einer Korrektur der nominalen Testkonzentration, wenn die Abweichung für den Ausreißer korrigierten Mittelwert der analysierten  $t_0$ -Konzentration gegenüber der nominalen Konzentration größer ist als die Varianz (Standardabweichung) der Konzentrationsbestimmung zu  $t_0$ . Die zu  $t_{24}$  analysierte höchste Testkonzentration diente der Kontrolle der Substanzstabilität. Bei einer Abweichung von kleiner oder gleich 20 % gegenüber der analysierten  $t_0$ -Konzentration wurde die Substanz als stabil betrachtet.

Für Chloralhydrat, für das keine analytische Methode zur Verfügung stand, wurde die wäßrige Stammlösung den Testbedingungen über die Testdauer ausgesetzt und anschließend eine Toxizitätstestung durchgeführt. Das Ergebnis wurde mit einer frisch angesetzten Lösung verglichen und bei einer Abweichung der EC50 von kleiner 20 % die Substanz als stabil betrachtet. Als Konzentration wurde die Nominalkonzentration verwendet. Die Analyse der Nominalkonzentrationen der metallorganischen Verbindungen Tributylzinnchlorid (TBTC) und Triphenylzinnchlorid (TPTC) wurde von Mitarbeitern der Sektion Analytik des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle GmbH (UFZ) durchgeführt. Gerätetechnische Schwierigkeiten bei der gaschromatographischen Analyse der Nominalkonzentration von Tributylzinnchlorid (TBTC) erlaubten keine eindeutige Interpretation des Analyseergebnisses für diese Substanz. Die Korrektur der nominalen Testkonzentration betreffend wurde TBTC so behandelt wie Triphenylzinnchlorid und die nominale Testkonzentration nicht korrigiert.

Die durch Analyse der höchsten Testkonzentration gewonnenen Informationen über die biotische Stabilität werden dadurch eingeschränkt, daß die bei dieser Konzentration des Wirkstoffs überlebenden Algen in qualitativer sowie quantitativer Hinsicht eventuell für die metabolische Umsetzung der Substanz nicht mehr relevant sein könnten. Von einer alternativen Analyse geringer Testkonzentrationen wurde allerdings Abstand genommen, da die für einige Substanzen extrem niedrigen Konzentrationen ein routinemäßiges und für alle Einzelstoffe einheitliches Vorgehen nicht zugelassen hätten.

Tab. 4: Übersicht der chromatographischen Methoden zur Analyse der Konzentrationen der Einzelstoffe der multiplen Mischung.

Substanz	Methode	Stationäre Phase	Mobile Phase	Flußrate [mL/min]	Detektion <sup>5</sup>
Atrazin	rp-HPLC <sup>1</sup>	LiChrospher 60 rp 18 Select B, 75 x 4, 5µm	MeOH 60% / H2O 40%	0,5	DAD (222nm)
Biphenyl	rp-HPLC <sup>1</sup>	LiChrospher 100 rp 18 encapped, 125 x 4mm, 5µm	MeOH 90% / H2O 10%	0,5	DAD (254nm)
2,4,5-Trichlorphenol	rp-HPLC <sup>1</sup>	LiChrospher 100 rp 18 encapped, 125 x 4mm, 5µm	ACN 70% / 0,01%ige H3PO4 30%	0,7	DAD (285nm)
Fluoranthen	rp-HPLC <sup>2</sup>	LiChrospher PAH 250-3	MeOH 100%	0,5	F (270/440nm)
Lindan	GC <sup>3</sup>	Ultra 2, 25 x 0,32 mm, 0,17µm	Helium	1,48	ECD
Naphthalin	rp-HPLC <sup>2</sup>	LiChrospher 60 rp 18 Select B, 75 x 4, 5µm	ACN 60% / H2O 40%	0,5	F (275/350nm)
Parathion	rp-HPLC <sup>1</sup>	LiChrospher 60 rp 18 Select B, 75 x 4, 5µm	MeOH 70% / H2O 30%	0,5	DAD (275nm)
Phoxim	rp-HPLC <sup>1</sup>	LiChrospher 100 rp 18 encapped, 125 x 4m, 5µm	MeOH 80% / H2O 20%	0,75	DAD (285nm)
Tributylzinnchlorid	GC <sup>4</sup>	HP 1, 25 x 0,32, 0,17µm	Helium	2,5	AED (326,2nm)
Triphenylzinnchlorid	GC <sup>4</sup>	HP 1, 25 x 0,32, 0,17µm	Helium	2,5	AED (326,2nm)

- 1 Geräte: Merk-Hitachi Interface (D-7000), DAD Detektor (L-7450), Autosampler (L-7250), Pumpe (L-7100), Solvent Degasser (L-7612).
- 2 Geräte: Merk-Hitachi Interface (D-7000), Fluorimetrie Detektor (L-7480), Autosampler (L-7200), Pumpe (L-7100), Solvent Degasser Degasys (DG-1210).
- 3 Gerät: GC 5890 von Hewlett & Packard.  
Anreicherung der Probe mittels Festphasenextraktion (SPME): 3 mL Glassäule mit rp-18 Festphase, Säulenaktivierung mit Aceton, Equilibrierung mit Kultivationsmedium, nach Extraktion Trocknung mit Luft (Unterdruck, 20 min), Elution mit Hexan bei anschließender Verdünnung 1:10.  
Temperaturen: Injektion 250°C 1 min splitless; Ofen (Anfang) 80°C für 8 min, Aufheizrate 6 °C/min auf 250°C (8,7 min).
- 4 Gerät: GC-AED Hewlett & Packard G2350A).  
Ethylierung mit Na-acetat und Essigsäure (pH 5) und Natriumtetraethylborat (0,4%) und anschließender Anreicherung mittels Festphasenextraktion (SPME); Temperaturen: Injektion 250°C; Ofen (Anfang) 60°C, Aufheizrate 30 °C/min auf 300°C (2min); Transfer-line 300°C; Cavity 300°C.
- 5 DAD = Dioden Array Detektion  
F = Fluorimetrischer Detektion  
ECD = Elektronenfang Detektion  
AED = Atom Emmissions Detektion

### ALKOHOLE UND CHLORPHENOLE

Die nominalen Konzentrationen der wäßrigen Stammlösungen der verwendeten Chlorphenole (vgl. Tab. 15, Kapitel 3.1.3) wurden analytisch bestimmt. Ihr Mittelwert bildete den Bezugspunkt für die Festlegung der eingesetzten Testkonzentrationen. Für die Konzentrationsanalyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde als feste Phase eine C18-Säule, 5µm, (LiChrospher 60 rp Select B, 75 x 4) eingesetzt mit einer mobilen Phase aus 60 % 0,01 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und 40 % ACN (Pentachlorphenol: 40 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 % / 60 % ACN) bei einer Flußrate von 0,5 mL/min und einer Temperatur von 25°C. Zur Detektion wurde ein *Dioden Array Detektor* (DAD) mit einer Wellenlänge von 285 nm (PCP: 230 nm) verwendet. Für Alkohole wurden Nominalkonzentrationen verwendet.

### 2.3.3 Schätzung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

Auf der Basis der experimentell ermittelten Toxizitätsdaten der Einzelstoffe soll der Zusammenhang zwischen den eingesetzten Konzentrationen und den beobachteten Effektintensitäten funktional beschrieben werden. Die Wahl des Regressionsmodells für eine bestmögliche Anpassung an die Datenlage ist von wesentlicher Bedeutung, wenn der Beitrag so geringer Effekte der Komponenten von 1 % zur Toxizität der Mischung untersucht werden soll. Die für die Beschreibung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen herkömmlich verwendeten Modelle wie Weibull, Logit oder Probit, wurden diesen Anforderungen und der für die verschiedenen Substanzen unterschiedlichen Datenlagen nicht gerecht. Ein in ihrer Anpassungsflexibilität den Anforderungen an die Anpassungsqualität und den Datenlagen für die Einzelsubstanzen adäquates Vorgehen stellt die Anwendung des Verfahrens des *best-fit-modeling* dar (Scholze et al., 2001), das von Scholze (Universität Bremen) für die Toxizitätsdaten der für die multiple Mischung selektierten Einzelsubstanzen durchgeführt wurde. Dabei wird aus einem Pool von 10 nicht linearen, parametrischen Regressionsmodellen (Tab. 5) jenes ausgewählt, das nach statistischer Schätzung der Regressionsparameter die Datenlage am besten beschreibt. Die Beurteilung der Anpassungsgüte erfolgt dabei nach dem Kriterium der *sum of absolute errors* in Verbindung mit Residuenanalyse. Die optimale Anpassung des Modells wird durch die Anwendung des *generalized-least-square*-Verfahrens gewährleistet und zwar mit sogenannter nicht-parametrischer Gewichtsschätzung, die die Effektniveau abhängige Effektvarianz berücksichtigt (*Heteroskedasizität*). Die auf diese Weise geschätzten Effektkonzentrationen werden mit Unsicherheiten angegeben, die mit einem Resampling-Verfahren (bootstrap) bestimmt worden sind.

Tab. 5: Übersicht über die zur Modellierung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe verwendeten Regressionsmodelle (Scholze et al., 2001).

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

Anmerkung:  $\theta_1, \theta_2$  und  $\theta_3$  kennzeichnen die zu bestimmenden, unbekanntenen Modellparameter. *Effekt* ist der zu erwartende, relative Effekt (definiert zwischen 0 und 1) einer definierten Substanzkonzentration (*Konz.*).

\* Synonym wird nachfolgend der *Generalized Logit 1* auch als *Generalized Logit* bezeichnet.



## 2.4 Kombinations-Wirkungs-Analyse

Das Verfahren zur Analyse von Kombinationswirkungen (Kapitel 2.4.1) macht es notwendig, Bedingungen festzulegen, die eine experimentelle Umsetzung des Verfahrens ermöglichen (Kapitel 2.4.2). Elementarer Teil der Kombinations-Wirkungs-Analyse ist die Berechnung der nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGER WIRKUNG prognostizierten Mischungstoxizität, was daher in einem separaten Kapitel besprochen wird (Kapitel 2.4.3).

### 2.4.1 Konzeption

Die Analyse von Kombinationswirkungen besteht aus mehreren aufeinander aufbauenden Komponenten (Abb. 6). Die Konzentrations-Wirkungs-Analyse der Einzelstoffe bildet die Grundlage der gesamten Studie (Abb. 6). Die Toxizitätsinformationen, die auf der Basis der Konzentrations-Wirkungs-Analyse der Einzelstoffe gewonnen werden, entscheiden einerseits über die Art der Zusammenstellung der Einzelstoffe zu einer Mischung (Kapitel 2.4.2). Andererseits bilden sie die Datenbasis für die Berechnung der zu erwartenden Mischungstoxizität unter Verwendung dazu geeigneter Konzepte (Kapitel 2.4.3). Das Stoffgemisch wird im Rahmen einer Konzentrations-Wirkungs-Analyse in einem Biotest auf seine Wirksamkeit geprüft. Die beobachtete Mischungstoxizität wird anschließend mit den konzeptionellen Prognosen verglichen, um die Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität beurteilen zu können.

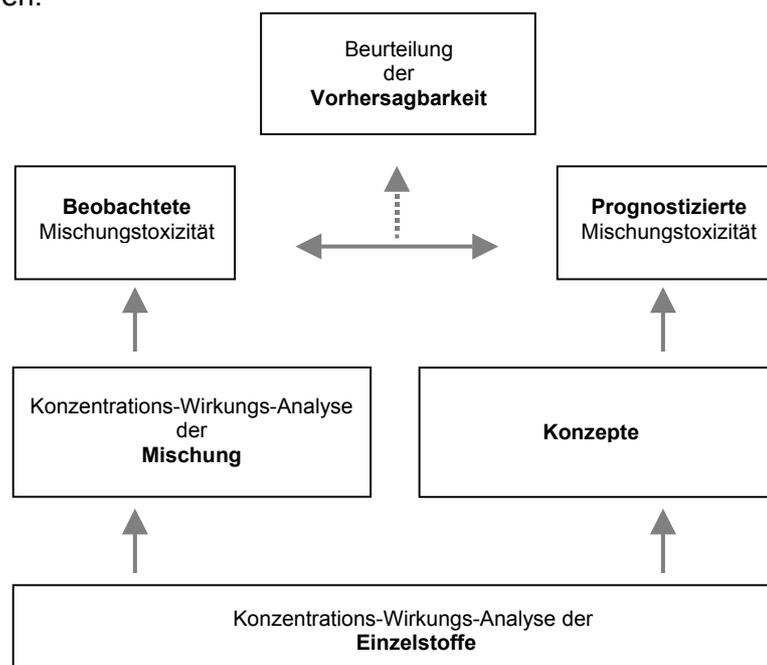


Abb. 6: Konzeption der Kombinations-Wirkungs-Analyse (modifiziert nach Grimme et al., 1998)

### 2.4.2 Experimenteller Ansatz

Neben der *Art* und der *Anzahl* der Mischungskomponenten wird ein Stoffgemisch noch durch ihre *Gesamtkonzentration* und das *Verhältnis der Konzentrationen*, in dem die Komponenten in der Mischung vorliegen, charakterisiert. Nachdem die Substanzen selektiert sind (Kapitel 2.2) stehen mit Art und Anzahl der Komponenten schon zwei von vier Größen fest, die eine Mischung charakterisieren. Die Toxizitätstestung der multiplen Mischung kann daher entweder bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen der Komponentenkonzentrationen und gleichzeitig konstanter Gesamtkonzentration der Mischung erfolgen, oder im entgegengesetzten Design, bei „fixem“ Mischungsverhältnis der Konzentrationen der Komponenten zueinander und variabler Gesamtkonzentration der Mischung (*“fixed-ratio-Design“*, Grimme et al., 1994). Für die Testung der multiplen Mischung dieser Arbeit wurde das fixed-ratio-Design verwendet. Im Unterschied zu einer punktuellen Toxizitätsermittlung ermöglicht dieses Design die Beschreibung der Mischungstoxizität für einen Konzentrationsbereich in Form einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Die Ermittlung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für das Stoffgemisch ermöglicht nicht nur die Berechnung der zu erwartenden Mischungstoxizität nach *beiden* Konzepten, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT *und* UNABHÄNGIGER WIRKUNG (vgl. Kapitel 1.4), sondern erlaubt darüber hinaus die Beurteilung der Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität für mehrere Effektebenen. Die multiple Mischung dieser Arbeit wurde bei 3 verschiedenen Verhältnissen der Konzentrationen der Mischungskomponenten auf ihre Wirksamkeit geprüft.

#### EC50-DESIGN

Eine klassische Herangehensweise zur Analyse der Kombinationswirkung eines Stoffgemisches ist das EC50-Design. Bei jeglicher Gesamtkonzentration der Mischung liegen die Komponenten in Konzentrationen vor, die dem Verhältnis ihrer EC50-Werte entsprechen. Im EC50-Design liegen die Komponenten in der Mischung in Konzentrationen vor, die  $1/n$  ( $n = \text{Anzahl der Komponenten}$ ) ihres individuellen EC50 entsprechen. Vor dem Hintergrund unterschiedlicher Steilheiten der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe bedeutet das jedoch, daß die Komponenten bei den Konzentrationen, mit denen sie in der Mischung vorliegen, äußerst unterschiedliche Effekte erzeugen können. Während eine Komponente mit flacherem Verlauf ihrer Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei  $1/n$  ihrer EC50 beispielsweise einen vergleichsweise hohen Effekt erzeugt, generieren andere Komponenten mit extrem steilen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bei  $1/n$  ihrer EC50 einen äußerst geringen Effekt, der eventuell unterhalb der Grenze für Effekte mit statistisch

signifikantem Unterschied zum Kontrollwert liegt. Wesentliche Voraussetzung für die Beurteilung der Vorhersagbarkeit der Toxizität einer Mischung ist aber die statistische Sicherheit, daß die Mischungskomponenten bei den Konzentrationen, mit denen sie in der Mischung vorliegen, Effekte generieren, die für die Komponente als Einzelstoff noch valide zu quantifizieren sind. Dies gilt insbesondere für Mischungstoxizitätsprognosen, die auf dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG beruhen, da die Berechnung des Erwartungswertes auf den Effekten der Komponenten beruht, die diese bei Konzentrationen in der Mischung erzielen (vgl. Kapitel 1.4).

Die Mischung im EC50-Design wurde in 7 unabhängigen Versuchsansätzen auf ihre Wirksamkeit getestet (Tab. 6). Teilweise wurden die wäßrigen Stammlösungen der Komponenten für mehrere Versuchsansätze verwendet. Insgesamt wurden die wäßrigen Stammlösungen aller 11 Komponenten 4 Mal neu angesetzt. Für die Mehrzahl der Versuchsansätze wurden mehrere Verdünnungsreihen unabhängig pipettiert (Datensätze, vgl. Tab. 6). Insgesamt wurde die Mischung in 15 Datensätzen auf ihre Wirksamkeit getestet. Dabei war die Anzahl der Konzentrationen je Datensatz sowie die Anzahl identischer Konzentrationen je Versuchsansatz unterschiedlich (Konzentrationen als Triplikate, Replikate oder als einzelne Konzentrationen in Tab. 6). Insgesamt wird die Mischungstoxizität durch 155 Datenpunkte mit 39 unbehandelten Kulturen als Kontrollen beschrieben (Tab. 6).

#### EC01-DESIGN

Zusätzlich zum EC50-Design wurde die Mischung aus o. g. Gründen auf ihre Wirksamkeit untersucht, wenn die Komponenten in der Mischung im Verhältnis der Konzentrationen vorliegen, bei denen diese als Einzelstoff genau 1 % Effekt erzeugen (EC01-Design). Da dieser Effekt unterhalb der Effekte liegt, den die Einzelstoffe bei ihren NOECs (no observed effect concentration, vgl. Kapitel 1.6) erzeugen (vgl. Abb. 13, Kapitel 3.2.1), stellt diese Benchmarkkonzentration eine konservative Operationalisierung des NOEC dar.

Die Mischung im EC01-Design wurde in 6 unabhängigen Versuchsansätzen auf ihre Wirksamkeit getestet (Tab. 7). Teilweise wurden die wäßrigen Stammlösungen der Komponenten für mehrere Versuchsansätze verwendet. Insgesamt wurden die wäßrigen Stammlösungen aller 11 Komponenten 4 Mal neu angesetzt. Für die Mehrzahl der Versuchsansätze wurden mehrere Verdünnungsreihen unabhängig pipettiert (Datensätze, vgl. Tab. 6). Insgesamt wurde die Mischung in 13 Datensätzen auf ihre Wirksamkeit getestet. Dabei war die Anzahl der Konzentrationen je Datensatz sowie die Anzahl identischer

Konzentrationen je Versuchsansatz unterschiedlich (Konzentrationen als Triplikate, Replikate oder als einzelne Konzentrationen in Tab. 7). Insgesamt wird die Mischungstoxizität durch 140 Datenpunkte mit 36 unbehandelten Kulturen als Kontrollen beschrieben (Tab. 7).

### NOEC-DESIGN

Zusätzlich wurde die Mischung noch bei einer Gesamtkonzentration getestet, die der Summe der NOECs der Einzelstoffe entspricht (NOEC-Design). Dazu wurde der NOEC der Einzelstoffe im *Dunnett*-Test geschätzt (Dunnett, 1955). Im NOEC-Design wurde die Toxizität der multiplen Mischung in 2 unabhängigen Versuchsansätzen mit insgesamt 32 Replikaten der Mischungskonzentration und 12 Kontrollen ermittelt. Die wässrigen Stammlösungen aller 11 Komponenten wurden für beide Versuchsansätze unabhängig voneinander angesetzt.

Für die Ermittlung der Toxizität der Mischung im NOEC-Design bei veränderten pH-Bedingungen des Algenmediums wurden in einem Versuchsansatz 14 Replikate und 6 Kontrollen eingesetzt.

Die Berechnungen der Konzentrationen der Komponenten in der Mischung beruhen ohne Ausnahme für jeden Versuchsansatz, unabhängig vom verwendeten Mischungsdesign, auf vorher analytisch ermittelten Konzentrationen der wässrigen Stammlösungen. Für den ersten Versuchsansatz der Mischungstestung wurde die Wirkung aller Einzelstoffe in einem parallelen Versuchsansatz erfolgreich auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft.

Tab. 6: Quantitative Übersicht der Versuchsansätze, Datensätze und Konzentrationen der Mischung im EC50-Design.

Versuchsansatz	Wäßrige Stammlsg <sup>1</sup>	Datensätze <sup>2</sup>	Konzentrationen je Datensatz <sup>3</sup>	Konzentrationen Je Versuchssatz	Konzentrationen				
					als Triplikate	als Duplikate	einzeln	Kontrollen	
A	A	3	9, 9, 10	28	27	-	-	1	6
B	A	1	8	8	-	-	-	8	5
C	A+	2	8, 8	16	-	16	-	-	5
D	B	3	12, 12, 11	35	33	2	-	-	6
E	B+	1	20	20	-	-	-	20	6
F	C	3	11, 12, 12	35	34	1	-	-	6
G	D	2	7, 6	13	-	-	-	12	5
-----									
Summe: 7	4	15		155	94	19		41	39

- 1 Gleiche Buchstaben stehen für identische wäßrige Stammlösungen der Mischungskomponenten in verschiedenen Versuchsansätzen.  
+ = wäßrige Stammlösung *einer* Mischungskomponente ist neu angesetzt worden.
- 2 Die Konzentrations-Effekt-Daten einer unabhängig pipettierten Verdünnungsreihe stellen einen Datensatz dar.
- 3 Unterschiedliche Anzahlen entstehen durch Herausnehmen von Außerreißern nach Dateninspektion.

Tab. 7: Quantitative Übersicht der Versuchsansätze, Datensätze und Konzentrationen der Mischung im EC01-Design.

Versuchsansatz	Wäßrige Stammlsg <sup>1</sup>	Datensätze <sup>2</sup>	Konzentrationen je Datensatz <sup>3</sup>	Konzentrationen Je Versuchssatz	Konzentrationen				
					als Triplikate	als Duplikate	einzeln	Kontrollen	
A	A	2	11, 11	22	-	22	-	-	6
B	A	3	8, 8, 8	24	24	-	-	-	6
C	B	3	9, 11, 11	31	27	4	-	-	6
D	B++	1	15	15	-	-	-	15	6
E	C	3	12, 12, 12	36	36	-	-	-	6
F	D	1	12	12	-	-	-	12	6
-----									
Summe: 6	4	13		140	87	26		27	36

- 1 Gleiche Buchstaben stehen für identische wäßrige Stammlösungen der Mischungskomponenten in verschiedenen Versuchsansätzen.  
+ = wäßrige Stammlösung *einer* Mischungskomponente ist neu angesetzt worden.
- 2 Die Konzentrations-Effekt-Daten einer unabhängig pipettierten Verdünnungsreihe stellen einen Datensatz dar.
- 3 Unterschiedliche Anzahlen entstehen durch Herausnehmen von Außerreißern nach Dateninspektion.

### 2.4.3 Vorhersagen der Mischungstoxizität

Das Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT für eine multiple Mischung aus  $i$  Komponenten kann algorithmisch ausgedrückt werden als

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{X_i}} = 1 \quad [ \text{Gl. 6} ]$$

wobei die Komponenten  $i$  bis  $n$  in der Mischung in Konzentrationen  $c$  vorliegen, die Teil der Gesamtkonzentration der Mischung sind, bei der diese denselben Effekt von  $X\%$  erzeugt wie die Komponenten als Einzelstoffe, wenn sie in entsprechenden Konzentrationen ( $EC$ ) vorliegen.

Da die Komponenten in der Mischung in Konzentrationen vorliegen, die einem fixen Anteil einer beliebigen Gesamtkonzentration der Mischung entsprechen (*fixed-ratio-Design*), kann die Konzentration jeder Komponente in der Mischung ( $c$ ) auch als Produkt dieser Fraktion ( $p$ ) und einer beliebigen Gesamtkonzentration der Mischung ( $C$ ), bei der diese einen bestimmten Effekt ( $E$ ) von  $X\%$  generiert, ausgedrückt werden:

$$c_i = p_i * EC_X(\text{Gemisch}) \quad [ \text{Gl. 7} ]$$

Durch Einsetzen von Gleichung 7 in Gleichung 6 und deren Umformung ist die Berechnung einer prognostizierten Effektkonzentration der multiplen Mischung für ein beliebiges Effektniveau ( $EC_X$  (Gemisch)) möglich:

$$EC_X(\text{Gemisch}) = \left( \sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_{X_i}} \right)^{-1} \quad [ \text{Gl. 8} ]$$

Für eine graphische Darstellung der vorhergesagten Mischungstoxizität nach dem Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT werden die so berechneten Prognosewerte zu einer Kurve verbunden.

Bei einer als unabhängig voneinander angenommen unähnlichen Wirkungsweise der Komponenten einer multiplen Mischung gilt:

$$E(c_{\text{Gemisch}}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_i)) \quad [ \text{Gl. 9} ]$$

wobei der Effekt der Mischung bei ihrer Gesamtkonzentration  $E(c_{\text{Gemisch}})$  auf den Effekten der Einzelstoffe basiert, die diese als Mischungskomponenten in Konzentrationen, mit denen sie in der Mischung vorliegen ( $E(c_i)$ ), erzeugen. Wird letztere als fraktionaler Anteil der Gesamtkonzentration der Mischung ausgedrückt, gilt:

$$E(c_{\text{Gemisch}}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(p_i * c_{\text{Gemisch}})) \quad [\text{Gl. 10}]$$

So kann für eine beliebige Gesamtkonzentration der Mischung entsprechend dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG ein Effekt berechnet werden.



# 3 Ergebnisse



---

## **3 Ergebnisse**

Die Toxizitätsinformationen der Einzelstoffe bilden den Ausgangspunkt für jede Kombinations-Wirkungs-Analyse einer Mischung. Die Ergebnisse der Charakterisierung der Algentoxizität der Mischungskomponenten werden deshalb zu Beginn dargestellt (Kapitel 3.1), bevor anschließend die darauf Bezug nehmenden Ergebnisse der Untersuchungen zur Algentoxizität der multiplen Mischung dargelegt werden (Kapitel 3.2). Abschließend werden die ermittelten Daten zur Abhängigkeit der Kombinationswirkung vom Milieufaktor pH erörtert (Kapitel 3.3).

### **3.1 Untersuchungen zur Algentoxizität der Mischungskomponenten**

Wesentlicher Bestandteil der Analyse von Kombinationswirkungen ist die Ermittlung der Toxizität der Einzelstoffe, die als Komponenten die multiple Mischung bilden. Die Qualität der ermittelten Toxizitätsdaten der Einzelstoffe bestimmt die Qualität der gesamten Untersuchung. Die physikochemischen Eigenschaften der selektierten Einzelstoffe stellen erhöhte Anforderungen an ihre Handhabung und das Testprotokoll im Vergleich zu Standardbiotests. Deshalb werden erst die Charakteristika dieser „schwierig testbaren“ Substanzen betrachtet (Kapitel 3.1.1) bevor die Ermittlung ihrer Toxizität (Kapitel 3.1.2) besprochen wird. Im Hinblick auf die Bewertung der Vorhersagbarkeit und Beurteilung einer eventuell zu beobachtenden Kombinationswirkung der Mischung wird anschließend die Wirkungsspezifität der Einzelstoffe betrachtet, um die Ähnlichkeit der vorliegenden Wirkungsweisen einschätzen zu können (Kapitel 3.1.3).

#### **3.1.1 Charakterisierung der Testsubstanzen**

Die ausgewählten 11 Substanzen (Tab. 2 und 3, Kapitel 2.2) stellen ein ökotoxikologisch relevantes Chemikaliengemisch dar, wie es auch im Freiland vorliegen könnte. Nicht nur auf europäischer Ebene durch die Aufnahme in die EG Prioritätsliste „Liste 1“ werden die selektierten Chemikalien in ihrer toxikologischen Bedeutung für die aquatische Umwelt als prioritär betrachtet. Auch nach dem deutschen Wasserhaushaltsgesetz werden die 11 selektierten Substanzen in die beiden höchsten Wassergefährdungsklassen 2 und 3 (wassergefährdende und stark wassergefährdende Substanzen) eingestuft. Die Heterogenität ihrer Strukturen (Tab. 3), ihre Verwendung als Pflanzenbehandlungsmittel und

Zwischenprodukte industrieller Produktion (Tab. 8) und die für die Mehrzahl der Substanzen unbekanntem Wirkungsmechanismen sind Merkmale eines Chemikaliengemisches, wie es im Freiland zu finden sein könnte.

Die OECD Richtlinie zur "aquatischen Toxizitätstestung schwieriger Substanzen" (2000) gibt Indikatorwerte für eine Reihe von physikochemischen Eigenschaften an, bei deren Überschreitung Schwierigkeiten bezüglich der Stabilität der Konzentrationen während der Vorbereitung der Testlösung und der Toxizitätstestung der Substanzen zu erwarten sind. Für diese Fälle werden Modifikationen des Standardtestverfahrens empfohlen. Nach den Kriterien der OECD (2000) stellen für die 11 Substanzen insbesondere ihre Wasserlöslichkeit, Flüchtigkeit, Hydrophobizität,

Tab.8: Anwendungen der Mischungskomponenten

Substanz	CAS RN	Anwendung/Auftreten
Atrazin	1912-24-9	Herbizid
Biphenyl	92-52-4	Fungizid, organische Syntheseprozesse
Chloralhydrat	302-17-0	Herstellung von DDT
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Herstellung von Herbiziden und Pestiziden
Fluoranthen	206-44-0	Zigarettenrauch, Verbrennung fossiler Brennstoffe
Lindan	58-89-9	Insektizid
Naphthalin	91-20-3	Insektizid, Synthese von Azofarbstoffen, Lösungsmittel;
Parathion	56-38-2	Insektizid
Phoxim	14816-18-3	Insektizid
Tributylzinnchlorid	1461-22-9	Antifouling, Katalysator chemischer Reaktionen
Triphenylzinnchlorid	639-58-7	Antifouling, Katalysator chemischer Reaktionen

Molekulargewicht und biotische Abbaubarkeit kritische Parameter dar: insgesamt können demnach 8 der 11 Stoffe als "schwierig testbare" Komponenten bezeichnet werden (Tab. 9). Beispielsweise kann für Fluoranthen mit der geringsten Wasserlöslichkeit aller Substanzen von 0,23 mg/L, vergleichsweise hoher Lipophilie ( $\log K_{ow}$  5,2) und einer Henry-Konstante, die mit 0,12 PA\*m<sup>3</sup>/mol über dem von der OECD angegebenen Indikatorwert von 0,1 PA\*m<sup>3</sup>/mol liegt, nicht nur das Erreichen einer Testkonzentration, die zur Erzielung eines angestrebten Mindesteffektes von 80% benötigt wird, problematisch sein. Auch die Stabilität der Testkonzentrationen über die Testdauer kann durch Adsorption an die Oberfläche der Testgefäße oder an die der Algen und/oder durch Verflüchtigung während der Testvorbereitung beeinträchtigt werden. Nach Thomas (1990) gelten Substanzen schon dann als flüchtig, wenn die Henry-Konstante zwischen  $3 \cdot 10^{-7}$  und  $10^{-3}$  atm m<sup>3</sup> / mol liegt, als

nicht flüchtig falls kleiner, als stark flüchtig falls höher. Im Vergleich zur OECD Bewertung wären demnach nicht nur 6 der 11 Substanzen als flüchtig anzusehen, sondern sogar 8 von 11 Chemikalien (Tab. 9).

In der Literatur werden unterschiedliche Formen abiotischen Abbaus aufgezeigt, die allerdings teilweise für Bedingungen beschrieben werden, die von den Konditionen des verwendeten Algentests erheblich abweichen. Die z. B. für Naphthalin für Blaualgen beschriebene Bildung des Metaboliten 1-Naphtol ist daher ohne Prüfung der Gültigkeit für das verwendete Testsystem, in dem Grünalgen als Testorganismen verwendet werden, nicht übertragbar. Literaturangaben zum abiotischen Abbau der Substanzen wurden daher primär als qualitative Informationen genutzt.

Tab.9: Daten von physikochemischen Eigenschaften der Mischungskomponenten im Vergleich zu Indikatorwerten der OECD (2000) und Thomas (1990). Werte größer als die angegebenen Indikatorwerte sind fett gedruckt \*.

Substanz	MG [g/mol]	Wasserlöslichkeit [mg/L]	$\log K_{ow}$ <sup>1</sup>	Henry-Konstante [Pa*m <sup>3</sup> /mol; 25°C]	Abiotische Abbaubarkeit
Atrazin	215,7	27,8 <sup>2</sup>	2,6	0,00031 <sup>3</sup>	stabil <sup>1</sup>
Biphenyl	154,2	6,9 <sup>2</sup>	4,0	<b>43,06</b> <sup>2</sup>	stabil <sup>6</sup>
Chloralhydrat	165,4	$\infty$ <sup>2</sup>	1,0	0,011 <sup>2</sup>	keine Angaben
2,4,5-Trichlorphenol	197,5	1190 <sup>1</sup>	3,7	<b>0,041</b> <sup>2*</sup>	ionisierbar <sup>1</sup>
Fluoranthren	202,3	<b>0,23</b> <sup>2</sup>	<b>5,2</b>	<b>0,12</b> <sup>3</sup>	stabil <sup>4</sup>
Lindan	290,8	7,3 <sup>2</sup>	<b>4,1</b>	0,0000043 <sup>2</sup>	Dehydrochlorination <sup>6</sup>
Naphthalin	128,2	30,8 <sup>2</sup>	3,3	<b>37,49</b> <sup>2</sup>	Photolyse <sup>1</sup> / Metabolitenbildung <sup>1</sup>
Parathion	291,3	6,5 <sup>2</sup>	3,8	<b>0,23</b> <sup>3</sup>	Photooxidation <sup>1</sup>
Phoxim	298,3	4,1 <sup>2</sup>	<b>4,4</b>	<b>7,34</b> <sup>3</sup>	Photolyse <sup>1</sup> / Hydrolyse <sup>1</sup>
Tributylzinnchlorid	<b>596,1</b>	98,9 <sup>2</sup>	<b>5,8</b>	<b>2,75</b> <sup>5</sup>	Hydrolyse <sup>1</sup> / Photodegradation <sup>4</sup>
Triphenylzinnchlorid	<b>385,5</b>	5 <sup>1</sup>	2,8	<b>0,078</b> <sup>5*</sup>	Hydrolyse <sup>1</sup> / Photodegradation <sup>4</sup>
Indikatorwert	<b>300</b> <sup>7</sup>	<b>&lt; 1</b> <sup>7</sup>	<b>&gt; 4</b> <sup>7</sup>	<b>&gt; 0,1</b> <sup>7</sup> <b>&gt; 0,03 &lt; 101,3</b> <sup>8</sup>	

1 UBA, 1999

2 Datenbank PhysProp 96 (ISIS/Base, 1990)

3 berechnet mit Dampfdruck aus 4 und Wasserlöslichkeit aus 2

4 Richardson and Gangolli, 1994

\* Mit \* gekennzeichnete Werte beziehen sich auf den Indikatorwert aus 8

5 berechnet mit Dampfdruck aus 1 und Wasserlöslichkeit aus 2

6 Tomlin, 1997

7 OECD, 2000

8 Thomas, 1990

Bezüglich der Kriterien der OECD (2000) und nach Thomas (1990) sind die nominalen Konzentrationen und die stoffliche Stabilität der selektierten Substanzen insgesamt als unsicher zu betrachten. Das erfordert nicht nur Modifikationen des verwendeten Testsystems und bei der Handhabung der Substanzen, sondern vor allem eine Validierung der Nominalkonzentrationen der verwendeten Stammlösungen und der behandelten Proben.

#### 3.1.2 Einzelstofftoxizitäten im Algenbiotest

Wesentliche Anforderungen an die zu ermittelnden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe sind eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit bei gleichzeitig niedriger Varianz der Beobachtungswerte, sowie die Richtigkeit der Konzentrationen, für die Effektdaten ermittelt wurden (vgl. Kapitel 2.3). Vor dem Hintergrund der physikochemischen Eigenschaften der Mischungskomponenten, die sie als schwierig zu testende Substanzen charakterisieren (vgl. Kapitel 3.1.1), wurden mehrere Schritte zur Qualitätskontrolle und –sicherung unternommen.

In einem ersten Schritt wurde in mehreren, unabhängigen Versuchen mit reduziertem Testdesign die Wirksamkeit der Substanzen bei maximaler Löslichkeit im Testmedium und die Stabilität der Testkonzentrationen über die Versuchsdauer geprüft sowie die Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Substanzen ermittelt (vgl. Kapitel 2.3.1). Versuchswiederholungen wurden dabei grundsätzlich mit verschiedenen wäßrigen Stammlösungen mit analytisch bestimmten Konzentrationen durchgeführt.

In anschließenden Experimenten zur Ermittlung der Toxizität der Einzelstoffe wurde die auf der Basis der analytisch ermittelten Konzentration der wäßrigen Stammlösung berechnete höchste Testkonzentration ebenfalls analytisch validiert und ihre Abweichung mit der Varianz des Analytikergebnisses verglichen und bewertet (vgl. Kapitel 2.3.2). Für 8 der 11 Substanzen wurde die nominale Testkonzentration zu Testbeginn ( $c_{10}$  nominal) auf die analysierte Konzentration normalisiert (Tab. 10). Außerdem wurde die Veränderung der Testkonzentration über die Testdauer bestimmt (vgl. Kapitel 2.3.2). Verglichen mit der Konzentration zu Testbeginn betrug der Konzentrationsverlust über die Testdauer für keine Substanz mehr als 13,5 % (Tab. 10). Eine Ausnahme bildet Triphenylzinnchlorid, dessen höchste Testkonzentration bei Testende nur noch 40,6 % der Anfangskonzentration betrug (Tab. 10). Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Triphenylzinnchlorid zeigte sich allerdings in allen Versuchswiederholungen gut reproduzierbar.

Tab. 10: Angaben zu den Abweichung zwischen den chromatographisch analysierten und den nominalen Testkonzentrationen der Substanzen zu Testbeginn ( $t_0$ ) und deren Bewertung sowie zur Stabilität der Testkonzentrationen über die Dauer des Algentestes.

Substanz <sup>1</sup>	Abweichung [%] <sup>2</sup>	Varianz [%] <sup>3</sup>	Korrektur	Konzentrationsverlust [%]
	( $c_{t_0}$ nominal - $c_{t_0}$ anal)	$c_{t_0}$ anal	$c_{t_0}$ nominal	( $c_{t_0}$ anal - $c_{t_{24}}$ anal)
Atrazin	2,9	11,2	nein	-2,5
Biphenyl	7,8	6,3	ja	0,1
2,4,5-TCP	8	6,5	ja	0,5
Fluoranthen	43,8	1,8	ja	13,4
Lindan	29,6	4,5	ja	-9,7
Naphthalin	25,1	6,2	ja	8,3
Parathion	20,5	5,1	ja	-1,3
Phoxim	18,9	2,5	ja	13,5
Tributylzinnchlorid	(90) <sup>4</sup>	(3,3) <sup>4</sup>	nein	(44,2) <sup>4</sup>
Triphenylzinnchlorid	21,4	25,6	nein	49,4

1 Chloralhydrat nicht chemisch analysiert

2 angegeben als [Betrag]

3 Standardabweichung

4 Gerätetechnische Probleme (vgl. Kapitel 2.3.2)

Die aufgenommenen Toxizitätsdaten wurden auf technisch oder verfahrenstechnisch erklärbare Ausreißer inspiziert und diese herausgenommen. Unter Anwendung des biometrischen Verfahrens des „*best-fit-modeling*“ (Scholze et al., 2001) wurden 10 verschiedene biometrische Modelle den experimentellen Daten angepaßt und die beste Anpassung als Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen modelliert (vgl. Kapitel 2.3.3).

Für Fluoranthen (Abb. 8) zum Beispiel wurden insgesamt 34 Datenpunkte in einem unabhängigen Triplikatansatz aufgenommen (helle Datenpunkte), wobei der verwendete Verdünnungsfaktor, der die Abstände der Testkonzentrationen bestimmt, auf Erkenntnissen über die Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung basiert, die in unabhängigen Versuchen gewonnen wurden. So wird eine Beschreibung des Effektbereiches von kleiner 1% bis über 80% mit 12 Testkonzentrationen möglich. Da die analysierte höchste Testkonzentration nur 56,2 % der Nominalkonzentration beträgt (vgl. Kapitel 3.1.1), werden die Testkonzentrationen entsprechend normalisiert (dunkle Datenpunkte in Abb. 8). Das *Generalized Logit* Modell beschreibt die Datenlage in diesem Fall in nahezu idealtypischer Weise (helle und dunkle Kurve in Abb. 8) und erlaubt die Schätzung selektierter Kenngrößen der Toxizität von Fluoranthen (EC01 und EC50). Für die EC50 kann ein Konfidenzbereich (95 %) angegeben werden, der 4,2% der EC50 entspricht. Für alle 11 Einzelstoffe beträgt dieser Wert durchschnittlich 6,7%.

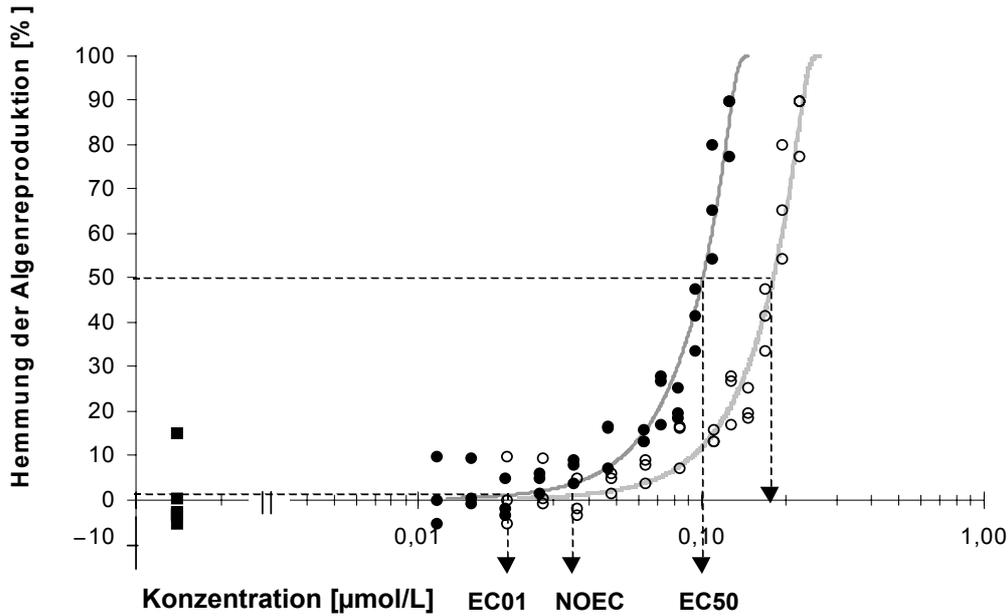


Abb. 8: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Fluoranthen für analytisch ermittelte (dunkle Daten-punkte und dunkle Kurve) und nominale Testkonzentrationen (helle Datenpunkte und helle Kurve).

Eine Übersicht der Funktionen, die für jede Substanz den Zusammenhang zwischen Konzentration und Effekt beschreibt (Abb. 9 und Tab. 11), veranschaulicht die Spanne der auftretenden Toxizitäten und unterschiedlichen Steilheiten der Konzentrations-Wirkungs-Verläufe.

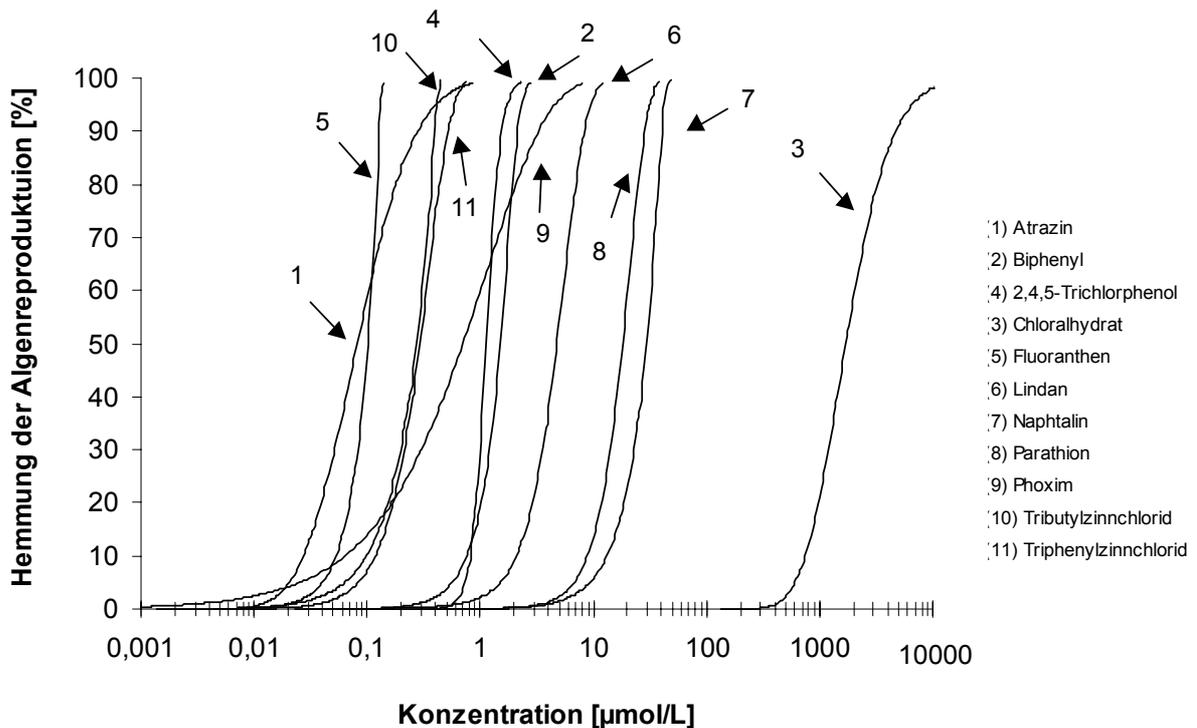


Abb. 9: Übersicht der Funktionen, die die Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge jeder Mischungskomponente beschreibt, wenn diese einzeln getestet werden.

Tab. 11: Verwendete Regressionsmodelle zur Beschreibung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der für die multiple Mischung selektierten Einzelstoffe mit statistisch geschätzten Parametern.

Substanz	Regressionsmodell <sup>1</sup>	Regressionsparameter		
		$\theta_1$	$\theta_2$	$\theta_3$
Atrazin	Box-Cox-Probit	2,461	0,866	-0,0987
Biphenyl	Generalized Logit	-7,032	23,194	0,2346
Chloralhydrat	Box-Cox-Probit	-26,67	7,304	-0,221
2,4,5-Trichlorphenol	Logit	-0,802	15,826	
Fluoranthen	Generalized Logit	82,844	94,777	0,0606
Lindan	Box-Cox-Probit	-2,027	0,817	0,5584
Naphthalin	Generalized Logit	-85,44	52,673	0,087
Parathion	Weibull	-8,001	6,071	
Phoxim	Weibull	-0,091	1,805	
Tributylzinnchlorid	Generalized Logit	30,977	82,956	0,0438
Triphenylzinnchlorid	Weibull	2,194	4,789	

<sup>1</sup> Für die Algorithmen der Modelle vgl. Tab. 6, Kapitel 2.3.3.

Die höchste Toxizität bei Betrachtung von 50%iger Wirksamkeit zeigt Atrazin mit einer EC<sub>50</sub> von 0,082 µmol/L (Tab. 12). Um den gleichen Effekt zu erzielen, müsste für die am wenigsten wirksame Substanz Chloralhydrat eine Konzentration eingesetzt werden, die um ca. 5 Größenordnungen höher liegt: 747 µmol/L. Ähnliches gilt für die Toxizitäten ausgedrückt in Konzentrationen, die 1% Effekt erzeugen (EC<sub>01</sub>): die geringste Toxizität von Chloralhydrat (419 µmol/L) unterscheidet sich um ca. 6 Größenordnungen von der höchsten Toxizität, die für Phoxim (3,2 nmol/L) ermittelt wurde.

Die Steilheiten der Konzentrations-Wirkungs-Funktionen sind als Verhältnis der EC<sub>10</sub>/EC<sub>90</sub> ausgedrückt (Tab. 12). 2,4,5-Trichlorphenol besitzt demnach die steilste Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Substanzen: eine Verdopplung der Konzentration, die 10% Effekt generiert, bewirkt eine Erhöhung des Effektes auf ca. 90 %. Im anderen Extremfall ist für Phoxim für die gleiche Effekterhöhung von 10 auf 90% eine 50-fach höhere Konzentration einzusetzen.

Tab. 12: EC01 und EC50 als Kenngrößen der Algentoxizität der als Einzelstoffe getesteten Mischungskomponenten.

Substanz	n <sup>1</sup>	n <sup>2</sup>	NOEC <sup>3</sup> [µmol/L]	EC01 [µmol/L]	+/- 95% CI	EC50 [µmol/L]	+/- 95% CI	EC50 [mg/L]	EC10/EC90
Atrazin	36	6	0,026	0,012	[0,0073 - 0,018]	0,082	[0,075 - 0,089]	0,018	0,098
Biphenyl	36	5	0,618	0,286	[0,178 - 0,443]	1,51	[1,38 - 1,64]	0,232	0,357
Chloralhydrat	36	7	649,73	419	[280 - 541]	1713	[1624- 1803]	282,6	0,158
2,4,5-TCP	72	12	0,795	0,576	[0,481 - 0,671]	1,12	[1,06 - 1,24]	0,221	0,528
Fluoranthen	34	6	0,063	0,021	[0,014 - 0,026]	0,10	[0,098 - 0,106]	0,020	0,412
Lindan	36	5	1,76	0,664	[0,117 - 1,033]	4,75	[4,60 - 4,90]	1,38	0,252
Naphthalin	72	11	9,49	4,14	[3,48 - 4,84]	29,57	[28,44 - 31,05]	3,78	0,326
Parathion	35	6	9,93	3,63	[2,45 - 5,09]	18,10	[17,18 - 19,20]	5,27	0,310
Phoxim	36	6	0,015	0,0032	[0,0021 - 0,0047]	0,704	[0,637 - 0,784]	0,210	0,020
Tributylzinnchlorid	36	6	0,113	0,228	[0,017 - 0,029]	0,273	[0,256 - 0,289]	0,089	0,248
Triphenylzinnchlorid	35	6	0,118	0,038	[0,029 - 0,051]	0,292	[0,265 - 0,321]	0,112	0,227

1 Datenpunkte

2 Kontrollen

3 berechnet mit dem DUNETT-Test

### 3.1.3 Wirkungsspezifität

Die Vorhersage und Beurteilung der Kombinationswirkung eines Chemikaliengemisches erfordert eine erwartete Referenzaktivität, mit welcher die beobachtete Kombinationswirkung verglichen werden kann. Die Verwendung der Konzepte KONZENTRATIONSADDITIVITÄT oder UNABHÄNGIGE WIRKUNG zur Vorhersage und Beurteilung von Kombinationswirkungen beruhen auf unterschiedlichen Annahmen über die Ähnlichkeit der Wirkungsweisen der Mischungskomponenten (vgl. Kapitel 1.2). Die Entscheidung für eines der Konzepte als Referenzkonzept ist daher abhängig von der Kenntnis der Ähnlichkeit der Wirkungsmechanismen der Komponenten der betreffenden Mischung. Für die vorliegende Mischung wird die Wahl des einen oder des anderen Konzeptes als Bezugspunkt für die Vorhersage und Beurteilung der Kombinationswirkung dadurch erschwert, daß die Wirkungsmechanismen der Komponenten größtenteils unbekannt sind (vgl. Kapitel 1.3). Um einen Eindruck zu bekommen, inwieweit die Substanzen eine membranschädigende Wirkung entsprechend dem Konzept der Narkose (Lipnick, 1995) als ähnliche Wirkungsweise gemein haben könnten, wird deren ermittelte Toxizität mit ihrer aufgrund der Lipophilie berechneten Minimumtoxizität verglichen (vgl. Kapitel 2.2). Eine im Vergleich zu ihrer Minimumtoxizität höhere Toxizität einer Substanz kann als Hinweis auf einen spezifischeren Wirkungsmechanismus als Narkose gewertet werden (Lipnick, 1995) (vgl. Kapitel 2.2).

Alkohole sind nicht-reaktive, nicht-ionisierte, organische Substanzen mit einer als unpolar narkotischen Wirkungsweise, die allein auf die Lipophilie der Substanzen zurückzuführen ist (Lipnick, 1995). Mit dem Ziel eine quantitative Struktur-Wirkungsbeziehung (QSAR) für Substanzen mit einer *unpolar* narkotischen Wirkungsweise zu erstellen, wurden zu erst die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von 7 Alkoholen ermittelt und ihre EC<sub>50</sub> regressionsanalytisch geschätzt (Tab. 14). Anschließend wurde diese Kenngröße der Toxizität in einer doppelt-logarithmischen Darstellung gegen die für jeden Alkohol spezifischen Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten, dem die Lipophilie beschreibenden Parameter, aufgetragen, und der Zusammenhang zwischen beiden Größen per linearer Regression quantitativ ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt. Auf gleiche Weise wurde vorgegangen, um eine weitere QSAR für Substanzen mit *polar* narkotischer Wirkung (Veith und Broderius, 1990) zu ermitteln. Polar narkotisch wirkende Substanzen gehen keine Reaktionen mit chemischen Strukturen ein und werden demnach als nicht-reaktiv eingestuft (Verhaar et al., 1992). Dennoch zeigen sie eine Toxizität, die im Vergleich zu ihrer Minimumtoxizität geringfügig höher ist. Der Grund dafür wird in einer starken Affinität für die Bindung von Wasserstoff, wie es z. B. Phenole oder Aniline zeigen, gesehen (Verhaar et al.,

1992). Für die Erstellung einer QSAR für polar narkotisch wirkende Substanzen wurden 6 Chlorphenole verwendet. Die experimentell ermittelte Chlorphenoltoxizität ist in Tab. 14 angegeben. Die stofflichen Identitäten der Chlorphenole und Alkohole sind in Tab. 15 aufgelistet.

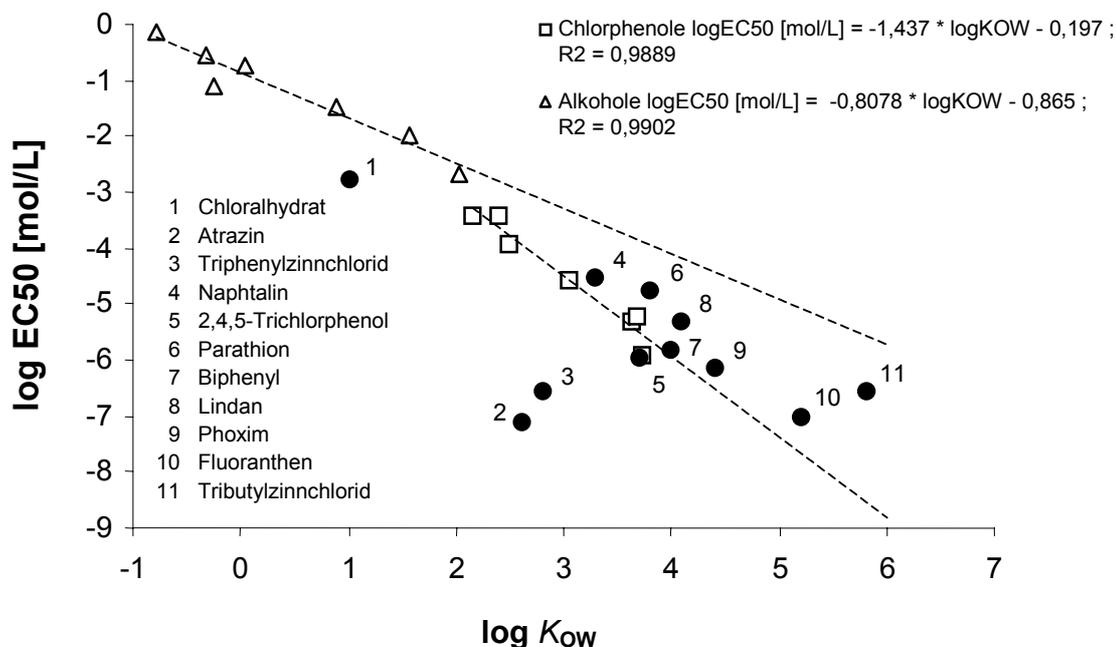


Abb. 10: Toxizitäten der Mischungskomponenten im Vergleich zu QSARs von Alkoholen und Chlorphenolen mit narkotischer bzw. polar narkotischer Wirkung.

Die  $\log EC_{50}$  versus  $\log K_{OW}$  Darstellung (Abb. 10) zeigt, daß die Mehrzahl der  $EC_{50}$ -Werte der Mischungskomponenten zwischen der unpolaren und der polaren Narkose QSAR liegen und die Toxizität der Substanzen durchaus als Ergebnis einer hauptsächlich hydrophoben Schadwirkung interpretiert werden könnte. Atrazin, 2,4,5-Trichlorphenol und Triphenylzinnchlorid zeigen dabei die größten Abweichungen in Richtung erhöhter Toxizität.

Verhaar et al. (1992) teilen Chemikalien aufgrund der Abweichung ihrer Toxizität von der Minimumtoxizität in 3 Gruppen unterschiedlicher Spezifität ihrer Wirkung ein. Entscheidungskriterium für die Gruppenzugehörigkeit ist die Größe des *Toxic Ratio* (TR), der das Verhältnis der Minimumtoxizität im Vergleich zur Toxizität der Substanz quantitativ beschreibt. Nach dieser Klassifizierung gehört Atrazin mit einem Toxic Ratio größer 12000 (Tab. 13) als einzige der selektierten Substanzen der Gruppe "spezifisch reaktiver Chemikalien" (Gruppe 3, Tab. 13) an, die selektive Reaktionen mit chemischen Strukturen eingehen. 5 der übrigen 10 Substanzen lassen sich mit TR kleiner 38 "gering inertem" Chemikalien (Gruppe 1, Tab. 13) mit einem polar narkotischen Wirkungsmechanismus

zuordnen. Alle anderen Substanzen der zu untersuchenden Mischung stellen nach Verhaar et al. "reaktive Chemikalien" (Gruppe 2, Tab. 13) dar, die nicht-selektive Reaktionen mit chemischen Strukturen, häufig von Biomolekülen, zeigen oder zu toxischeren Spezies metabolisiert werden.

Insgesamt kann eine allein auf eine unpolare hydrophobe Schädwirkung zurückzuführende narkotische Wirkungsweise als allen Substanzen gemeinsame Wirkungsweise weitgehend ausgeschlossen werden. Für den Großteil der Substanzen ist allerdings eine unspezifische Wirkungsweise anzunehmen, die zwischen unpolarer und polarer Narkose liegt. Einige Substanzen könnten aber auch eine in Algen spezifische Wirkungsweise besitzen (2,4,5-Trichlorphenol), für andere Substanzen ist dies bekannt: Atrazin inhibiert den photosynthetischen Elektronentransport (Frehse, 1991), während die Organozinn-Verbindungen als Inhibitoren der oxidativen Phosphorylierung bzw. Photophosphorylierung gelten (Fargasova, 1998). Zusammengenommen ist daher nicht auszuschließen, daß zumindest einige Substanzen gemeinsame Wirkungsmechanismen besitzen.

Tab. 13: Toxic Ratio für die Komponenten der multiplen Mischung

Substanz	$\log K_{OW}$ <sup>1</sup>	$EC50_{Minimum}$ <sup>2</sup> [µmol/L]	$EC50_{beobachtet}$ [µmol/L]	TR <sup>3</sup>	Bewertung der Spezifität der Wirkung <sup>4</sup>
Atrazin	2,6	1056,8	0,082	12888	3
Biphenyl	4	77,6	1,51	51	2
Chloralhydrat	1	20893,0	1713	12	1
2,4,5-Trichlorphenol	3,7	135,8	1,12	121	2
Fluoranthren	5,2	8,3	0,1	83	2
Lindan	4,1	64,4	4,75	14	1
Naphthalin	3,3	286,4	29,57	10	1
Parathion	3,8	112,7	18,1	6	1
Phoxim	4,4	36,8	0,704	52	2
Tributylzinnchlorid	5,8	2,7	0,273	10	1
Triphenylzinnchlorid	2,8	727,8	0,292	2492	2

1 UBA, 1999

2 Minimumtoxizität nach  $\log EC50 \text{ (mol/L)} = -0,81 * \log Po/w - 0,87$

3 Toxic Ratio =  $EC50_{Minimumtoxizität} / EC50_{beobachtet}$

4 nach Verhaar et al., 1992.

Tab. 14: Verwendete Regressionsmodelle und statistisch geschätzte Parameter zur funktionalen Beschreibung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Alkohole und Chlorphenole.

Substanz	log $K_{ow}$	Regressionsmodell <sup>1</sup>	A	B	C	EC50 [mol/L]	log EC50 [mol/L]
Methanol	-0,77	Hill	773,82	8,30	4,47	0,765	-0,12
Ethanol	-0,31	Logit	287,46	0,01	7,19	0,276	-0,56
1-Propanol	-0,25	Logit	75,55	0,07	-3,65	0,077	-1,12
2-Propanol	0,05	Hill	193,17	13,43	8,62	0,190	-0,72
Butanol	0,88	Logit	27,46	0,11	-46,59	0,033	-1,48
Pentanol	1,56	Hill	10,63	4,57	3,58	0,010	-1,98
Hexanol	2,03	Hill	2,13	1,66	-1,76	0,002	-2,66
2-Chlorphenol	2,15	Hill	37,27	1,73	-38,14	6,63E-05	-3,40
3-Chlorphenol	2,5	Hill	16,05	7,39	-2,29	6,92E-05	-3,90
4-Chlorphenol	2,39	Logit	48,48	0,09	0,00	7,16E-05	-3,42
2,4-Dichlorphenol	3,06	Logit	4,33	1,20	0,00	4,79E-05	-4,58
3,5-Dichlorphenol	3,62	Logit	0,80	14,05	-4,98	4,97E-05	-5,30
2,4,5-Trichlorphenol	3,72	Hill	1,19	2,10	0,00	3,49E-05	-5,92
2,4,6-Trichlorphenol	3,69	Hill	0,23	9,65	0,14	3,04E-05	-5,22

1 Hill-Modell :  $EC50 = A * (1 / ((100 - C) / (50 - C) - 1)) \exp(1/B)$   
 Logit-Modell :  $EC50 = A - (1/B * \ln((100 - C) / (50 - C) - 1))$

Tab. 15: Stoffliche Identitäten und Reinheitsgrade der für die Erstellung von QSAR verwendeten Substanzen.

Substanz	CAS RN	Bezugsquelle	Charge	Reinheit [%]
2-Chlorphenol	95-57-8	Merck	802253	>98
3-Chlorphenol	108-43-8	Merck	820321	>98
4-Chlorphenol	106-48-9	Merck	802254	>98
2,4-Dichlorphenol	120-83-2	Merck	802253	>98
3,5-Dichlorphenol	591-35-5	Aldrich	802963	99
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Riedel	30250	99
2,4,6-Trichlorphenol	88-06-2	Merck	821158	>98
Methanol	67-56-1	Merck	601235	>99
Ethanol	64-17-5	Merck	695214	97,2
1-Propanol	71-23-8	Merck	602387	99,5
2-Propanol	67-63-0	Merck	698321	99,7
Butanol	71-36-3	Merck	600235	99,5
Pentanol	71-41-0	Merck	601125	>99
Hexanol	111-27-3	Merck	690022	>98

## 3.2 Untersuchungen zur Algentoxizität der multiplen Mischung

Zur Durchführung einer Konzentrations-Wirkungs-Analyse einer multiplen Mischung wurden Testlösungen hergestellt, die alle 11 Einzelstoffe gleichzeitig enthalten. Die Einzelstoffe wurden in 3 verschiedenen Verhältnissen der Konzentrationen, mit denen sie in der Mischung vorliegen, zu einem multiplen Gemisch zusammengestellt. Diese Gemischlösungen wurden im Algentest auf ihre Wirksamkeit geprüft und anschließend auf eine Kombinationswirkung hin untersucht. Dazu wurde der beobachtete Mischungseffekt mit den Effekten, den die Einzelstoffe in den Konzentrationen erzeugen, mit denen sie in der Mischung vorliegen, verglichen (Kapitel 3.2.1). Für eine Beurteilung der Vorhersagbarkeit der Kombinationswirkung der Mischung wird der experimentell ermittelte Mischungseffekt den Prognosen gegenübergestellt, die auf den Konzepten KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG beruhen (Kapitel 3.2.2). Mit zusätzlichen Testungen der multiplen Mischung unter gezieltem Weglassen von Komponenten sollte festgestellt werden, ob einzelne Komponenten oder Gruppen von Komponenten die Stabilität des beobachteten Mischungseffektes beeinflussen (Kapitel 3.2.3).

### 3.2.1 Beobachtbarkeit

Zur Prüfung der Frage, ob der beobachtete Effekt der Mischung auf die Wirkung mehrerer Komponenten zurückzuführen ist, wird der beobachtete Mischungseffekt mit den Effekten der Komponenten verglichen, die diese bei den Konzentrationen, mit denen sie in der Mischung vorliegen, als Einzelstoffe erzeugen (Abb. 11, 12, 13). Liegt der beobachtete Mischungseffekt über, unter oder zwischen den Effekten der Einzelstoffe, ist davon auszugehen, daß mehr als nur eine Mischungskomponente zur beobachteten Wirkungsintensität der Mischung beigetragen hat und eine Kombinationswirkung vorliegt. Falls die ermittelte Wirkungsintensität des Gemisches dem Effekt eines Einzelstoffes entspricht, ist das Ergebnis zweideutig: der Mischungseffekt könnte schon mit der alleinigen Wirksamkeit dieser einen Komponente erklärt werden. Hypothetisch denkbar ist auch die zusätzliche Wirkung noch anderer Komponenten, die in Kombination zu einem Mischungseffekt geführt haben, der zufällig mit dem Effekt des Einzelstoffes übereinstimmt.

MISCHUNG IM EC50-DESIGN

Im EC50-Design liegen die Komponenten der multiplen Mischung in Konzentrationen vor, die dem Verhältnis der individuellen EC50 der Einzelstoffe entsprechen. Der beobachtete Effekt der Mischung ist oberhalb einer Gemischkonzentration von 400  $\mu\text{mol/L}$  deutlich größer als die Einzelstoffeffekte aller Komponenten. In diesem Konzentrationsbereich ist der Mischungseffekt eindeutig auf die Wirkung mehrerer Komponenten zurückzuführen (Abb. 11).

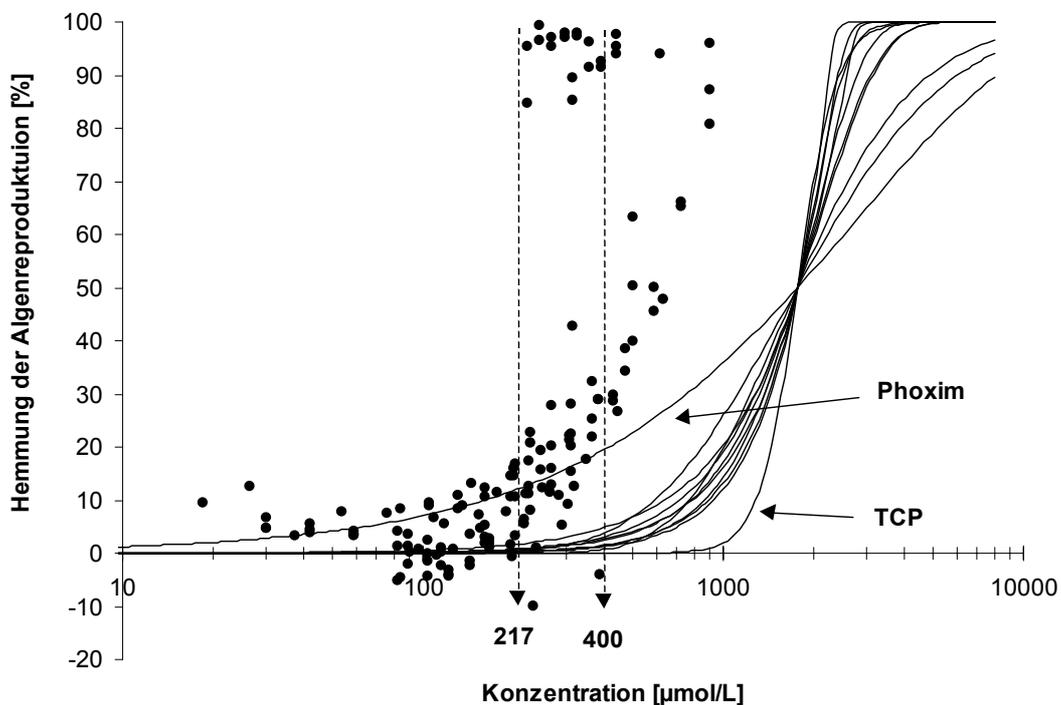


Abb. 11: Darstellung der Toxizitätsbefunde für die Mischung im EC50-Design (schwarze Datenpunkte) sowie der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Komponenten (Kurven) in Konzentrationen, mit denen sie in der Mischung vorliegen, berechnet auf Basis der ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe.

Im Konzentrationsbereich bis 217  $\mu\text{mol/L}$  zeigen die Daten des experimentell ermittelten Mischungseffektes eine relativ gute Übereinstimmung mit den Effekten der Komponente Phoxim, die diese bei den Konzentrationen, mit denen sie in der Mischung vorliegt, als Einzelstoff generiert. Zwischen einer Gesamtkonzentration von 217 bis 400  $\mu\text{mol/L}$  variieren die beobachteten Mischungseffekte zwischen ca. 20% und 90%, so daß eine Beurteilung für diesen Konzentrationsbereich nicht eindeutig ist. Aufgrund dieses Befundes ist nicht

auszuschließen, daß Phoxim im unteren Konzentrationsbereich bis 400 µmol/L die einzig wirksame Komponente darstellt. Allerdings wäre dann zu erklären, worin sich die Wirkungen der Komponenten in der Mischung im unteren Konzentrationsbereich bis 400 µmol/L im Vergleich zum darüberliegenden Konzentrationsbereich unterscheiden, für den ja der Mischungseffekt eindeutig auf die Wirkung mehrerer Komponenten zurückgeführt werden kann. Eine denkbare Erklärung für die beobachteten Gesamteffekte im unteren Konzentrationsbereich ist das Auftreten von physikochemischen Wechselwirkungen zwischen Komponenten oder von gegenseitigen Abhängigkeiten ihrer Wirkungen, mit dem Ergebnis, daß die Kombination ihrer Wirkungen zu den beobachteten Gesamteffekten der Mischung führt, die zufällig mit den von Phoxim erzeugten Effekten übereinstimmen. Falls die Mischungseffekte für Konzentrationen bis 400 µmol/L auf die alleinige Wirksamkeit von Phoxim zurückzuführen sein sollten, wäre zu erklären, weshalb die Effekte der Mischung und von Phoxim für Gesamtkonzentrationen oberhalb von 400 µmol/L nicht übereinstimmen. Denkbar wäre, daß die Interaktionen der Komponenten von den absoluten Konzentrationen der Komponenten in der Mischung abhängig sind. Die für enzymatische Reaktionen bekannten Änderungen der Wirkungsqualität (z. B. das Erreichen einer Schwellenkonzentration zur Auslösung einer spezifischen Enzymreaktion) und/oder der Quantität von intermolekularen Wechselwirkungen (z. B. allosterische Effekte) in Abhängigkeit der Konzentration könnten als Analogien für mögliche Erklärungsansätze dienen.

## MISCHUNG IM EC01-DESIGN

In Abb. 12 werden die experimentell ermittelten Effekte der Mischung, wenn die Komponenten in Konzentrationen vorliegen, die dem Verhältnis ihrer EC01-Werte entsprechen (EC01-Design), den entsprechenden Effekten der Einzelstoffe gegenüber gestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die beobachteten Mischungseffekte für alle getesteten Gesamtkonzentrationen größer sind als die Effekte der Komponenten, die diese in entsprechenden Konzentrationen als Einzelstoffe generieren. Die beobachtete Wirkungsintensität des Gemisches ist daher eindeutig auf die Wirksamkeit mehrerer Mischungskomponenten zurückzuführen.

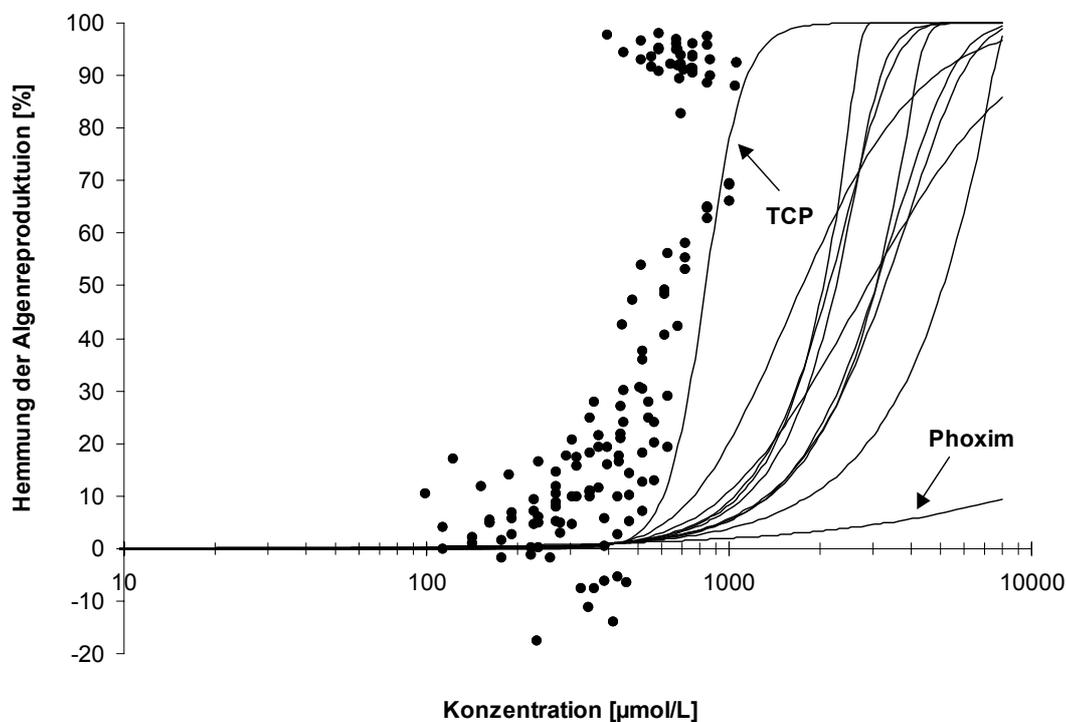


Abb. 12: Darstellung der Toxizitätsbefunde für die Mischung im EC01-Design (schwarze Datenpunkte) sowie der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Komponenten (Kurven) in Konzentrationen, mit denen sie in der Mischung vorliegen, berechnet auf Basis der ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe.

## MISCHUNG IM NOEC-DESIGN

Im NOEC-Design liegen die Komponenten in der Mischung in Konzentrationen vor, die ihren individuellen NOECs entsprechen. Der beobachtete Mischungseffekt ist mit 87,5 % signifikant verschieden von den Effekten, die jede Komponente in ihren NOECs als Einzelstoff generiert (Abb. 13). Die beobachtete Toxizität der Mischung im NOEC-Design kann daher auf die Wirksamkeit mehrerer Komponenten zurückgeführt werden.

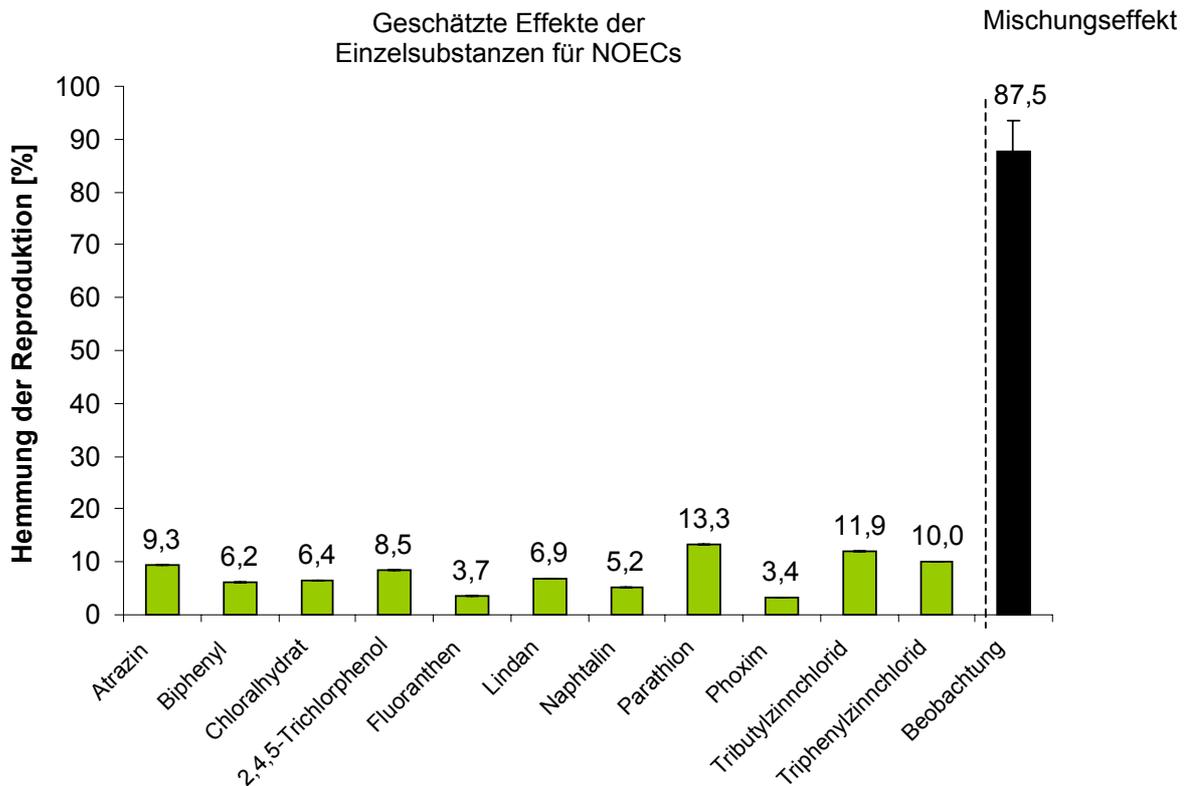


Abb. 13: Dargestellt ist die Kombinationswirkung der Mischung im NOEC-Design (schwarzer Balken) und die Effekte, die die Komponenten in der Mischung erzeugen, wenn sie in Konzentrationen vorliegen, die ihren individuellen NOECs entsprechen.

### 3.2.2 Vorhersagbarkeit

Die Beurteilung der Vorhersagbarkeit einer Kombinationswirkung eines Chemikaliengemisches beruht auf dem Vergleich zwischen der experimentell ermittelten Toxizität der Mischung und ihrer konzeptionellen Prognosen, die auf der Basis der Toxizitätsinformationen der Einzelstoffe berechnet werden (vgl. Kapitel 2.4.1).

#### MISCHUNG IM EC50-DESIGN

Für die Mischung im EC50 Design (Abb. 14) zeigt die Mehrzahl der Datenpunkte der beobachteten Mischungstoxizität (111 von 155 Datenpunkten; schwarze Punkte in Abb. 14) eine relativ gute Übereinstimmung mit der Prognose des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG. Einen Eindruck über die Größe der Differenz zwischen beobachteter und aufgrund der konzeptionellen Annahmen vorhergesagten Mischungstoxizität läßt sich aufgrund des *Index on Prediction Quality* (IPQ) gewinnen, der ein quantitatives Maß der Vorhersagegenauigkeit darstellt (Grimme et al., 1996a, Altenburger et al., 1996; vgl. Kapitel 1.5).

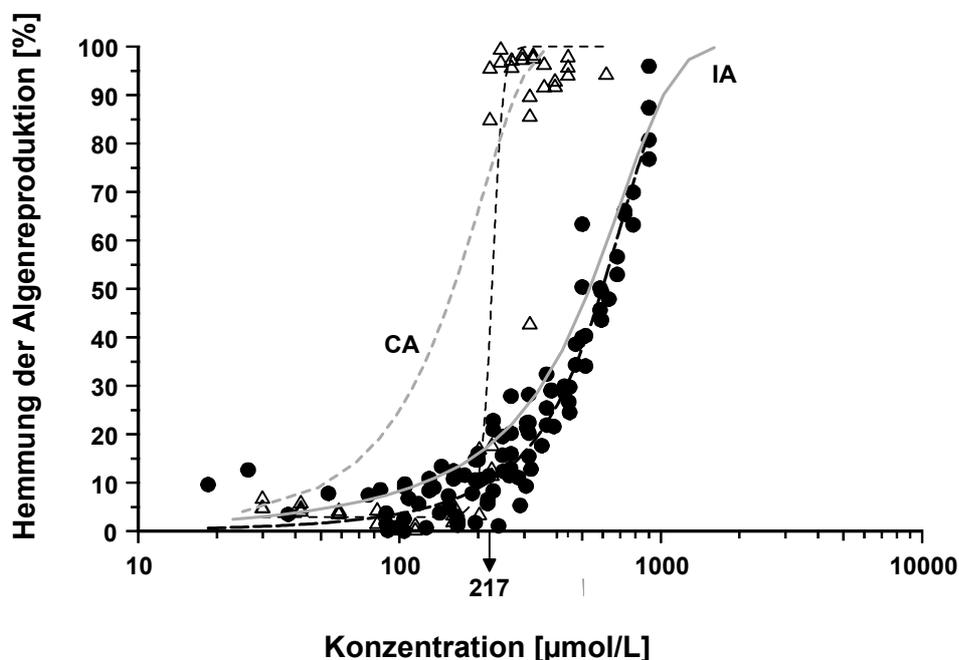


Abb. 14: Experimentell ermittelte Algentoxizität des 11 Komponenten Gemisches im EC50-Design. Von der Mehrheit der beobachteten Effekte (Punkte) abweichende Datenpunkte sind als Dreiecke gekennzeichnet. Die Erwartungen für den Kombinationseffekt nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT (CA ---) und UNABHÄNGIGER WIRKUNG (IA —) sowie die modellierten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der beobachteten Mischungstoxizität (---) sind zusätzlich dargestellt.

Ein darauf basierender Vergleich der aus den beobachteten Daten der Mischungstoxizität regressionsanalytisch geschätzten EC50 mit dem entsprechenden, nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG prognostizierten Wert quantifiziert die Abweichung von Beobachtung und Prognose für die Mehrzahl der Datenpunkte (72%) auf einen Faktor von 1,1 (Tab. 16). Diese Einschätzung wird allerdings durch die zusätzliche Betrachtung von 2 weiteren Datensätzen relativiert (44 von 155 Datenpunkten; Dreiecke in Abb. 14). Ihre Datenpunkte beschreiben eine Mischungstoxizität, die im unteren Konzentrationsbereich bis 217 µmol/L mit der Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG übereinstimmt, für anschließende, höhere Mischungskonzentrationen jedoch durch KONZENTRATIONSADDITIVITÄT beschrieben wird. Der Vergleich der regressionsanalytisch geschätzten EC50 mit dem Prognosewert nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG ergibt eine Abweichung um das 2,3-fache (Tab. 16). Grimme et al. (1994) fanden in Untersuchungen zu Kombinationswirkungen von 56 binären Gemischen aus Pestiziden für 80 % der Fälle eine Übereinstimmung mit der Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG mit einer maximalen Abweichung der Beobachtung von der Prognose um Faktor 2,0. Demnach steht nur die Mehrzahl der Datenpunkte in Abb. 14 in Übereinstimmung mit der Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG.

Insgesamt stimmt die beobachtete Toxizität der Mischung im EC50-Design im unteren Konzentrationsbereich bis 217µmol/L relativ gut mit der Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG überein. Für Mischungskonzentrationen größer als 217 µmol/L variiert die beobachtete Toxizität zwischen 20 und 90 % Effekt, so daß eine eindeutige Zuordnung einer der beiden konzeptionellen Prognosen nicht eindeutig möglich ist. Die überwiegende Mehrheit der für diesen höheren Konzentrationsbereich beobachteten Mischungseffekte ist allerdings relativ präzise mit dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG vorhersagbar.

Tab. 16: Abweichungen der beobachteten Algentoxizität der Mischung im EC50-Design von der Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG (IA), berechnet aufgrund des Index on Prediction Quality (IPQ) für EC50 Werte. Die für die Schätzung der EC50 verwendeten Regressionsmodelle und -parameter sind zusätzlich dargestellt.

Mischungstoxizität	Regressionsparameter <sup>1</sup>			EC50 [µmol/L]	Konfidenz +/- 95%	IPQ IA <sup>2</sup>	Abweichung von IA um Faktor
	A	B	C				
111 Datenpunkte	572,40	0,0048	-6,21	596,6	[559,0 - 634,3]	-0,13	1,1
44 Datenpunkte	226,24	0,0911	2,92	225,6	[218,4 - 232,8]	1,3	2,3
IA <sup>3</sup>	475,64	0,0041	-11,95	528,0	[514,8 - 541,1]		

<sup>1</sup> Logit-Modell:  $EC50 (\mu\text{mol/L}) = (A - (1/B * \text{LN}((100-C)/(50-C)-1)))$

<sup>2</sup> IPQ = (EC50 IA/EC50 beobachtet) -1 für ECx vorhergesagt > ECx beobachtet;  
IPQ = - (EC50 beobachtet/EC50 IA) +1 für ECx vorhergesagt < ECx beobachtet

<sup>3</sup> Lösung der Gleichung 9 nur iterativ möglich (vgl. Kapitel 2.4.3)

## MISCHUNG IM EC01-DESIGN

Im EC01 Design liegen die Komponenten in der Mischung in Konzentrationen vor, die dem Verhältnis der EC01 der Einzelstoffe entsprechen. Für Konzentrationen unterhalb 394  $\mu\text{mol/L}$  werden die beobachteten Mischungseffekte relativ gut durch die nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG berechnete Toxizität prognostiziert (Abb. 15). Für Mischungskonzentrationen größer 394  $\mu\text{mol/L}$  variieren die experimentell ermittelten Effekte zwischen ca. 20 % und 95 % und können ebensogut mit der Vorhersage nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT beschrieben werden. Betrachtet man allerdings die beobachtete Toxizität der Mischung im EC01 Design separat für die Daten, die in unabhängigen Einzelexperimenten ermittelt wurden (Datensatz) (Abb. 16), so zeigt sich eine auffällige Homogenität der Datenpunkte innerhalb

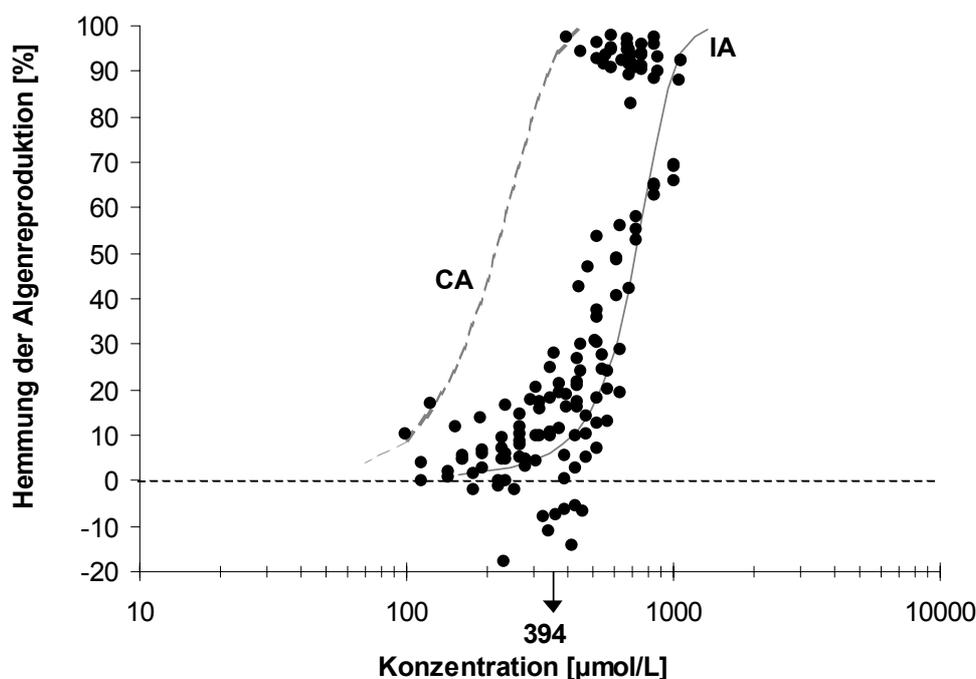


Abb. 15: Experimentell ermittelte Algentoxizität des 11 Komponenten Gemisches im EC01-Design. Die Erwartungen für den Kombinationseffekt nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT –CA– (---) und UNABHÄNGIGER WIRKUNG –IA– (—) sind zusätzlich dargestellt.

jedes Datensatzes: die noch bei gemeinsamer Betrachtung aller Datensätze auftretende Varianz der Effekte ist in dieser Form im Einzelexperiment nicht wiederzufinden. Der Eindruck einer großen Streuung der Datenpunkte entsteht offensichtlich durch die unterschiedliche Lage und Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für einzelne Datensätze, nicht durch Streuungen der Datenpunkte innerhalb jedes Datensatzes. Tab. 17 zeigt das Ergebnis des Vergleichs zwischen der für jeden Datensatz regressionsanalytisch geschätzten EC50 mit den nach beiden Konzepten prognostizierten Werten: insgesamt

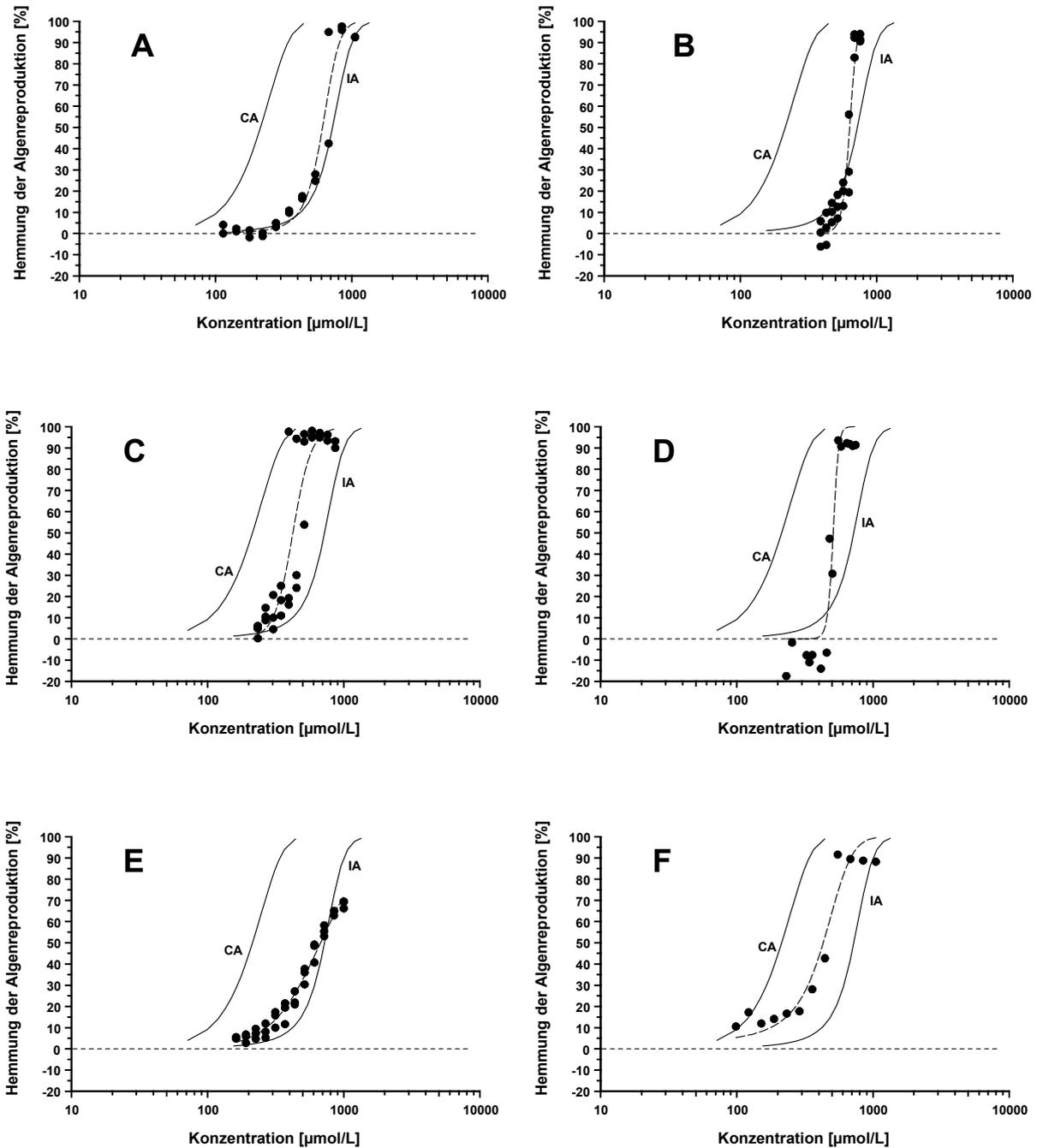


Abb. 16: Algentoxizität des 11 Komponenten Gemisches im EC01 Design getrennt nach den in unabhängigen Einzelexperimenten ermittelten Datensätzen (A – F). Für jeden Datensatz sind die ermittelten Datenpunkte der Mischungstoxizität (schwarze Punkte) und die erwartete Mischungstoxizität nach Konzentrationsadditivität (CA) und Unabhängiger Wirkung (IA) dargestellt (durchgezogene Linien). Für verwendete Regressionsmodelle und -parameter siehe Tab. 17.

beträgt die Differenz zwischen beobachteter und nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG prognostizierter Mischungstoxizität je nach Datensatz zwischen Faktor 1,1 und 1,7. Verglichen mit dem von Grimme et al. (1994) berechneten Faktor für die maximale Abweichung der Prognose von der Beobachtung für binäre Gemische (Faktor 2,0) könnte dies als eine unsystematische Abweichung von der Erwartung nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG gewertet werden. Bezogen auf die Vorhersage nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT wird die für die verschiedenen Datensätze beobachtete Mischungstoxizität um das 2,0- bis 3,2-fache überschätzt (Tab. 17). Grimme et al. geben in o. g. Untersuchung für 80% der Fälle der Übereinstimmung mit KONZENTRATIONSADDITIVITÄT eine maximale Differenz zwischen Beobachtung und Prognose um das 1,4-fache an.

Tab. 17: Faktoren der Über- und Unterschätzung der beobachteten Algentoxizität durch KONZENTRATIONSADDITIVITÄT (CA) und UNABHÄNGIGE WIRKUNG (IA) für die Datensätze der Mischungstestung im EC01-Design, berechnet aufgrund des Index on Prediction Quality (IPQ) für EC50 Werte. Die für die Schätzung der EC50 verwendeten Regressionsmodelle und -parameter sind zusätzlich dargestellt.

Datensatz	Regressions- Modell <sup>1</sup>	Regressionsparamete		EC50 [µmol/L]	Konfidenz +/- 95%	IPQ		IA unterschätzt um Faktor	CA überschätzt um Faktor
		A	B			IA <sup>2</sup>	CA <sup>3</sup>		
A	Logit	609,93	0,011	609,9	[589,0 - 630,9]	0,2	-1,9	1,2	2,9
B	Logit	633,88	0,025	633,9	[614,7 - 653,1]	0,1	-2,0	1,1	3,0
C	Hill	422,83	6,436	422,8	[385,5 - 460,2]	0,7	-1,0	1,7	2,0
D	Logit	509,92	0,043	509,9	[478,1 - 541,8]	0,4	-1,4	1,4	2,4
E	Hill	676,09	2,395	676,1	[623,7 - 728,5]	0,1	-2,2	1,1	3,2
F	Logit	430,91	0,009	430,9	[416,5 - 445,3]	0,7	-1,0	1,7	2,0
							∅	1,4	2,3
IA <sup>4</sup>	Logit	720,05	0,008	720,1	[717,5 - 722,6]				
CA <sup>5</sup>				213,7					

1 Hill:  $EC50 (\mu\text{mol/L}) = A \cdot (1 / ((100/50) - 1))^{1/B}$

Logit:  $EC50 (\mu\text{mol/L}) = A - (1/B \cdot (\ln(100/50)) - 1)$

2 IPQ =  $(EC50 (IA) / EC50 \text{ beobachtet}) - 1$

3 IPQ =  $-(EC50 \text{ beobachtet} / EC50 (CA)) + 1$

4 Lösung von Gleichung 10 nur iterativ möglich (vgl. Kapitel 2.4.3)

5 berechnet nach Gleichung 8 (vgl. Kapitel 2.4.3)

Insgesamt sprechen die Befunde für die Mischung im EC01-Design dafür, daß die beobachtete Mischungstoxizität für mittlere Effektkonzentrationen (EC50) mit dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG quantitativ gut vorhersagbar ist. Dabei ist die beobachtete Mischungstoxizität etwas toxischer als nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG prognostiziert. Die bei gemeinsamer Betrachtung aller Datensätze scheinbare Varianz der ermittelten Effekte ist auf Unterschiede in Lage und Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der einzelnen

Datensätze zurückzuführen, die in sich einen größtenteils homogenen Verlauf zeigen. Dennoch sind die bei höheren Gesamtkonzentrationen der Mischung ermittelten Effekte für einige Datensätze (insbesondere C, D und F, Abb. 16) genauer mit KONZENTRATIONSADDITIVITÄT als mit UNABHÄNGIGER WIRKUNG zu prognostizieren.

#### MISCHUNG IM NOEC-DESIGN

Im NOEC Design wurde die multiple Mischung der 11 Komponenten in nur einer Mischungskonzentration getestet, die der Summe der NOECs der Einzelstoffe entspricht. Für dieses Gemisch unterscheiden sich die Vorhersagen der Kombinationswirkung nach beiden Konzepten deutlich um mehr als 40 % Effekt (Abb. 17): 58 % nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG, 100 % nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT. Der beobachtete Mischungseffekt liegt mit 87,5 % zwischen beiden Prognosen, wird aber genauer unter Verwendung des Konzeptes der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT vorhergesagt als nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG.

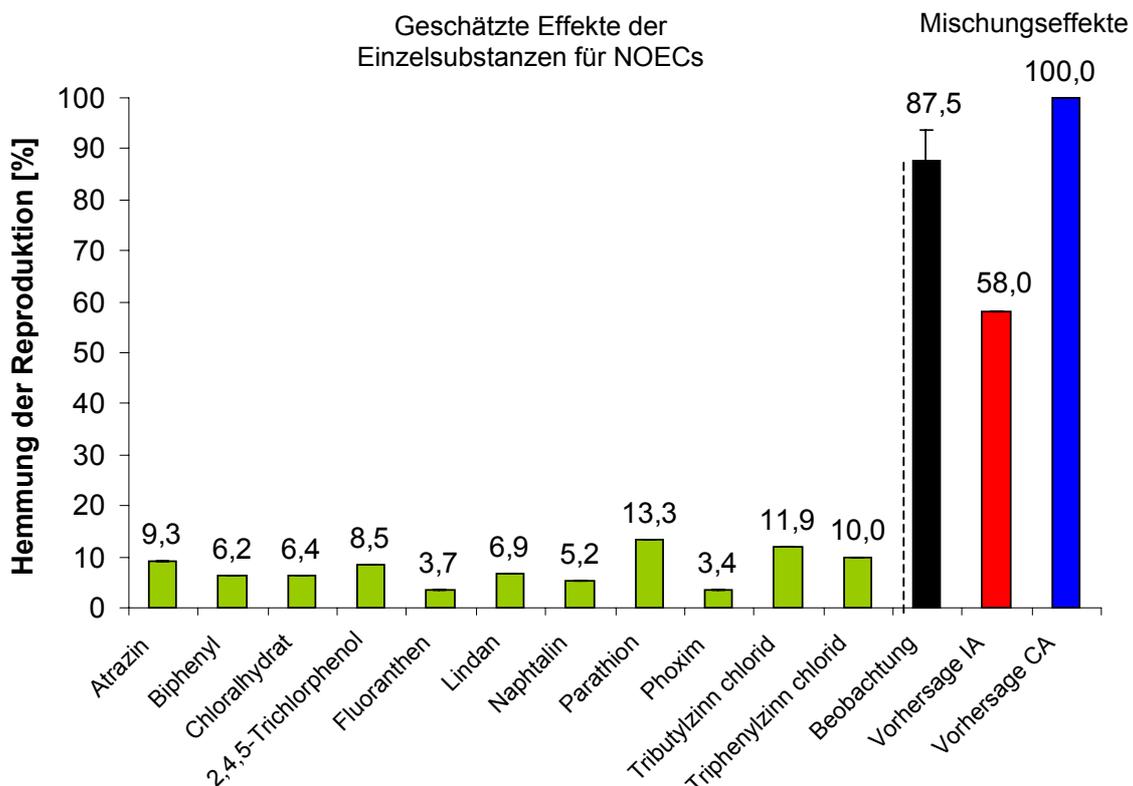


Abb. 17: Experimentell ermittelte Algentoxizität des 11-Komponenten-Gemisches im NOEC-Design. Zusätzlich zur prognostizierten Mischungstoxizität nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT (CA) und UNABHÄNGIGER WIRKUNG (IA) sind die Effekte der Komponenten dargestellt, die diese bei ihren individuellen NOECs in der Mischung erzeugen.

### 3.2.3 Stabilität der Vorhersagbarkeit

Die Untersuchungen zur Vorhersagbarkeit der Toxizität der multiplen Mischung im EC50- und EC01-Design ergeben mit Einschränkungen eine Prognostizierbarkeit der Kombinationseffekte nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG. Die Unähnlichkeit der Wirkungsmechanismen der Mischungskomponenten ist offensichtlich ausreichend, um die Kombinationswirkung der Mischung präziser nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorherzusagen als nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT. Da jedoch die Wirkungsmechanismen der meisten Mischungskomponenten unbekannt sind, kann nicht ausgeschlossen werden, daß ihre Wirkungsmechanismen ähnlich sind. Um die Wahrscheinlichkeit der für diesen Fall fälschlichen Verwendung des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG als "Referenzkonzept" zur Bewertung der Vorhersagbarkeit der Kombinationswirkung der vorliegenden multiplen Mischung zu reduzieren, wurden zusätzliche Untersuchungen mit der selben Mischung zur Stabilität ihrer Toxizität im EC50- und EC01-Design durchgeführt. Insgesamt wurden 10 zusätzliche Mischungsexperimente vorgenommen. In jedem Experiment wurde eine oder zwei Komponenten, von denen angenommen werden kann, daß sie die Toxizität des 11-Komponenten-Gemisches verändern vermögen, weggelassen.

#### VERKLEINERTE MISCHUNGEN IM EC50-DESIGN

Im EC50-Design wurde die Mischung in 5 Experimenten als 9- oder 10-Komponenten-Gemisch erneut getestet:

- ohne Fluoranthen und Naphthalin  
(Polyaromatische Kohlenwasserstoff-Verbindungen, *PAHs*)
- ohne Tributylzinnchlorid und Triphenylzinnchlorid  
(Organozinnverbindungen mit in Algen bekannter spezifischer Wirkung)
- ohne Atrazin und Parathion  
(Pestizide mit hoher Reaktivität und für Atrazin mit in Algen bekannter spezifischer Wirkung)
- ohne Chloralhydrat  
(Substanz mit höchstem molaren Anteil an der Mischung)
- ohne Phoxim  
(Substanz mit höchsten Effekten bei Konzentrationen in der Mischung)

Ein auf dem IPQ (Kapitel 3.2.2) basierender Vergleich der aus den beobachteten Toxizitäten der verkleinerten Mischungen regressionsanalytisch geschätzten EC50 mit dem für jede dieser 9- und 10-Komponenten Gemische nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagten Wert ergibt für alle Mischungen eine mittlere Differenz von Faktor 1,2 (Abb. 18, Tab. 18).

Tab. 18: Abweichungen der beobachteten Algentoxizität der 9- und 10-Komponenten Gemische im EC50-Design von der Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG (IA), berechnet aufgrund des Index on Prediction Quality (IPQ) für EC50-Werte. Die für die Schätzung der EC50 verwendeten Regressionsmodelle und -parameter sind zusätzlich dargestellt.

Nr.	Mischung ohne	Regressionsparameter <sup>1</sup>	EC50	IPQ <sup>2</sup>	Abweichung	
		A	B	[µmol/L]	IA	von IA um Faktor
1	Phoxim	497,7	0,0037	497,7	0,4	1,4
2	TBTC + TPTC	539,8	0,0038	539,8	0,1	1,1
3	Chloralhydrat	18,2	0,1463	18,2	-0,02	1,0
4	Fluoranthen + Naphthalin	627,8	0,0032	627,8	-0,1	1,1
5	Atrazin + Parathion	432,7	0,0045	432,7	0,4	1,4
					∅	1,2
	IA <sup>3</sup> zu 1	673,7	0,0056	673,7		
	IA <sup>3</sup> zu 2	613,3	0,0046	613,3		
	IA <sup>3</sup> zu 3	17,9	0,1477	17,9		
	IA <sup>3</sup> zu 4	570,8	0,0048	570,8		
	IA <sup>3</sup> zu 5	597,4	0,0047	597,4		

1 Logit:  $EC50 (\mu\text{mol/L}) = (A - (1/B * \text{LN}((100/50) - 1)))$

2 IPQ =  $(EC50 (IA) / EC50 \text{ beobachtet}) - 1$  für ECx vorhergesagt > ECx beobachtet

IPQ =  $-(EC50 \text{ beobachtet} / EC50 (IA)) + 1$  für ECx vorhergesagt < ECx beobachtet

3 Lösung der Gleichung 10 nur iterativ möglich

Dieses Ergebnis stimmt mit der Vorhersagbarkeit der Kombinationswirkung überein, die für 72% der Datenpunkte des 11-Komponenten Gemisches ermittelt wurde: die beobachtete und nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG prognostizierte Mischungstoxizität differiert um Faktor 1,1 (vgl. Tab. 16, Kapitel 3.2.2). Außerdem ist die für das 11-Komponenten Gemisch im EC50-Design beschriebene hohe Varianz der Effekte für Konzentrationen größer 217 µmol/L (Abb. 14; Kapitel 3.2.2) für keine der verkleinerten Mischungen zu beobachten, was zusätzlich die Validität der Vorhersagbarkeit der Toxizität der 11-Komponenten Mischung nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG auch für Gesamtkonzentrationen über 217 µmol/L unterstützt.

### 3.2 Untersuchungen zur Algentoxizität der multiplen Mischung

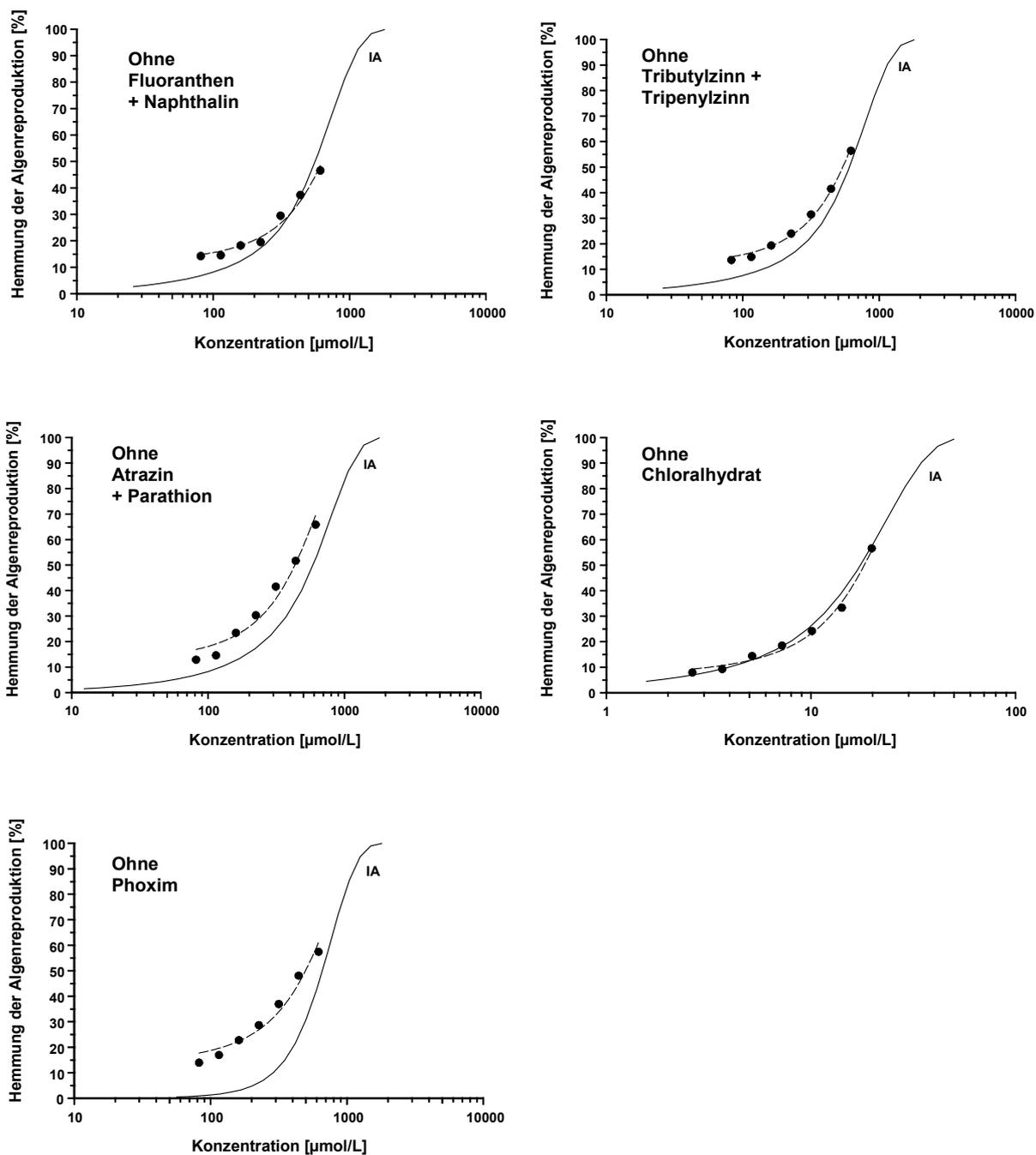


Abb. 18: Algentoxizitäten der 9- und 10-Komponenten Gemische im EC50-Design. Die modellierten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der verkleinerten Mischungen (---) sind jeweils ihren nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG (IA) berechneten Vorhersagen gegenüber gestellt (—).

Bei Verwendung des EC50-Designs scheinen die Kombinationseffekte der multiplen Mischung stabil reproduzierbar und nicht von einzelnen Komponenten oder Komponentengruppen abhängig zu sein. Insgesamt sind die Befunde für das 11-Komponenten Gemisch und der verkleinerten Gemische im EC50-Design starke Hinweise dafür, daß die Wirkungsmechanismen der Mischungskomponenten tatsächlich in einer Weise unähnlich sind, die ausreicht, um die Toxizität der Mischung für den gesamten Konzentrationsbereich mit dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG vorherzusagen.

#### VERKLEINERTE MISCHUNGEN IM EC01-DESIGN

Im EC01-Design wurde die Mischung in 5 Experimenten als 9- oder 10-Komponenten gemisch erneut getestet:

- ohne 2,4,5-Trichlorphenol  
(Ionogene Substanz mit höchsten Effekten in Konzentrationen in der Mischung)
- ohne Atrazin und Parathion  
(Pestizide mit hoher Reaktivität und für Atrazin mit in Algen bekannter spezifischer Wirkung)
- ohne Biphenyl  
(Substanz mit höchster Flüchtigkeit aller 11 Einzelstoffe)
- ohne Chloralhydrat  
(Substanz mit höchstem molaren Anteil an der Mischung)
- ohne Phoxim  
(Substanz mit hoher Adsorptivität und Flüchtigkeit)

Die Vorhersagbarkeit der Toxizität von allen 9- und 10-Komponenten Gemischen im EC01-Design ist mit einer mittleren Abweichung ihrer EC50 von dem nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG prognostiziertem Wert um Faktor 1,5 (Tab. 19) nahezu identisch mit der Vorhersagbarkeit aller Datensätze des 11-Komponenten Gemisches (Faktor 1,4) (Tab. 17; Kapitel 3.2.2).

Tab. 19: Abweichungen der beobachteten Algentoxizität der 9- und 10-Komponenten Gemische im EC01-Design von der Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG (IA). Die für die Schätzung der EC50 verwendeten Regressionsmodelle und –parameter sind zusätzlich dargestellt.

Nr.	Mischung ohne	Regressions-Modell <sup>1</sup>	Regressionsparameter		EC50 [µmol/L]	Abweichung von IA um Faktor
			A	B		
1	Atrazin + Parathion	Logit	532,9	0,0080	532,9	1,4
2	Biphenyl	Logit	469,6	0,0077	469,6	1,5
3	2,4,5-Trichlorphenol	Logit	637,7	0,0048	637,7	1,4
4	Phoxim	Logit	471,3	0,0074	471,3	1,5
5	Chloralhydrat	Logit	10,4	0,3670	10,4	1,5
					∅	1,5
	IA <sup>2</sup> zu 1	Hill	725,5	5,52	725,5	
	IA <sup>2</sup> zu 2	Hill	714,6	5,41	714,6	
	IA <sup>2</sup> zu 3	Hill	900,9	3,39	900,9	
	IA <sup>2</sup> zu 4	Hill	707,9	5,42	707,9	
	IA <sup>2</sup> zu 5	Hill	16,0	5,34	16,0	

1 Logit:  $EC50 (\mu\text{mol/L}) = (A - (1/B * \text{LN}((100/50) - 1)))$

Hill :  $EC50 (\mu\text{mol/L}) = (A * \text{POTENZ}((1/((100/50) - 1)); (1/B)))$

2 Lösung der Gleichung 10 nur iterativ möglich

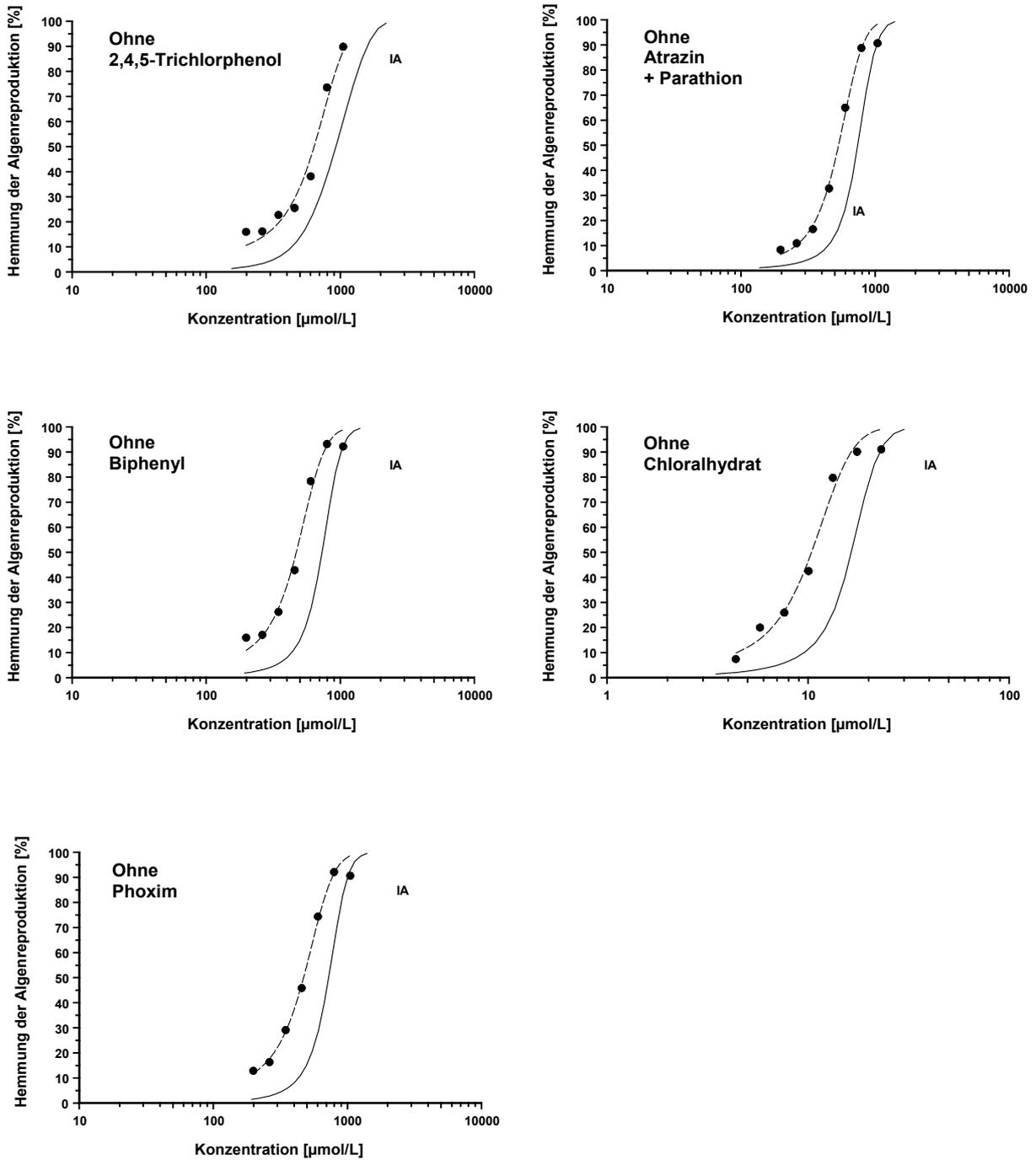


Abb. 19: Algentoxizitäten der 9- und 10-Komponenten Gemische im EC01-Design. Die modellierten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der verkleinerten Mischungen (---) sind jeweils ihren nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG (IA) berechneten Vorhersagen gegenüber gestellt (—).

Bei Verwendung des EC01-Designs scheinen die Kombinationseffekte der multiplen Mischung stabil reproduzierbar und nicht von einzelnen Komponenten oder Gruppen von Komponenten abhängig zu sein, sind jedoch – wie das 11-Komponenten Gemisch desselben Designs- ohne Ausnahme etwas toxischer als nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagt. Die für die 9- und 10-Komponenten Gemische ermittelte Vorhersagbarkeit ihrer Toxizität nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG ist auch quantitativ in guter Übereinstimmung mit der Vorhersagbarkeit des 11-Komponenten Gemisches. Dies ist ein Indiz dafür, daß die Wirkungsmechanismen der Mischungskomponenten tatsächlich in einer Weise unähnlich sind, die ausreicht, um die Toxizität der multiplen Mischung mit dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG vorherzusagen. Ferner geben die Ergebnisse keine Hinweise für eine Erklärung der auffälligen Varianz der Effekte, die für höhere Gesamtkonzentrationen des 11-Komponenten Gemisches beobachtet wurde.

### 3.3 Abhängigkeit der Kombinationswirkung vom Milieufaktor pH

Zur Untersuchung des Einflusses des Milieufaktors pH auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung des vorliegenden Chemikaliengemisches wurde zuerst die pH-abhängige Toxizität der ionogenen Mischungskomponente, 2,4,5-Trichlorphenol (TCP), quantitativ charakterisiert (Kapitel 3.3.1). Anschließend wurde die multiple Mischung bei veränderten pH-Bedingungen des Testmediums erneut getestet und die zu erwartende Toxizität unter Berücksichtigung der pH-abhängigen Toxizität von TCP berechnet (Kapitel 3.3.2). Zusätzlich wurde die unter Standardbedingungen beobachtete Toxizität der multiplen Mischung in Anbetracht der tatsächlichen pH-Bedingungen während der Mischungstestung reanalysiert. Abschließend wird die pH-abhängige Toxizität ionogener Substanzen am Beispiel von Phenol-Derivaten analysiert, um deren Ursachen besser zu verstehen (Kap. 3.3.3). Da eine in Abhängigkeit des pH-Wertes beobachtete Veränderung der Toxizität der Substanzen auch auf eine pH-abhängige Veränderung der Empfindlichkeit der Algen zurückzuführen sein könnte (vgl. Kapitel 2.1, Abb. 4), wurde zusätzlich der Einfluß des pH-Wertes auf die Toxizität nicht-ionogener Substanzen geprüft.

#### 3.3.1 Charakterisierung der pH-Wert abhängigen Toxizität von 2,4,5-Trichlorphenol

Zur Untersuchung der Frage, welchen Einfluß der pH-Wert auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung eines Chemikaliengemisches hat, sollten zuerst die Einzelstoffe auf eine pH-Abhängigkeit ihrer Toxizität überprüft werden, da die berechnete Toxizität der Mischung auf den Toxizitätsinformationen der Einzelstoffe basiert (vgl. Kapitel 2.4.1).

Da 2,4,5-Trichlorphenol (TCP) sowohl eine Mischungskomponente als auch eine ionogene Substanz darstellt mit zudem bekannter pH-Abhängigkeit ihrer Toxizität, wurde diese für *Scenedesmus vacuolatus* untersucht und quantitativ charakterisiert. Für TCP wurden bei insgesamt 9 pH-Werten, für einen Bereich von pH 6,4 bis 8,1, Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen aufgenommen (Abb. 20) und EC50-Werte regressionsanalytisch ermittelt (Tab. 20). Limitierend für die gewählte Spanne des pH-Bereiches ist einerseits die reduzierte Algenvermehrung für zunehmend alkalischeres Medium (bei pH > 8 ist diese kleiner 4), was zur Verschlechterung des Signal-Rausch Verhältnisses führt, und andererseits die Abnahme der Pufferkapazität bei geringen pH-Werten.

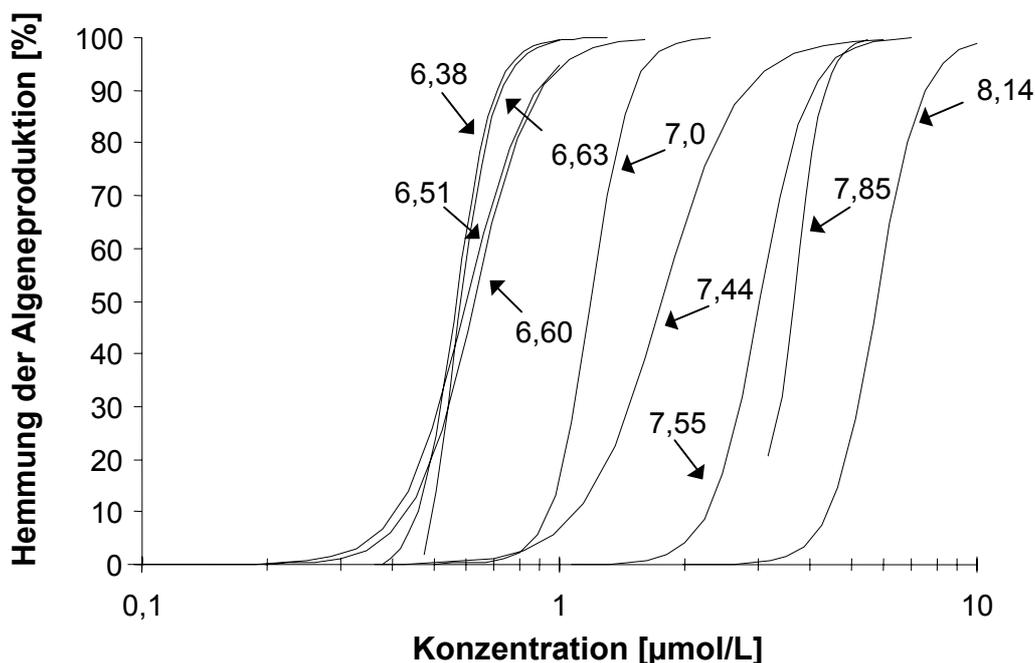


Abb. 20: Die modellierten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von 2,4,5-Trichlorphenol bei 9 verschiedenen pH-Werten des Testmediums.

Tab. 20: Regressionsanalytisch geschätzte EC50 von TCP bei verschiedenen pH-Werten sowie dazu verwendete Regressionsparameter.

pH	Regressionsparameter <sup>1</sup>				EC50 ± 95% CI (µmol/L)
	X50	P	Max	Min	
6,38	0,563548	9,675396	100	-1,95558	0,57 ± 0,03
6,51	0,598687	5,656978	100	0	0,60 ± 0,06
6,60	0,625678	6,040982	100	0	0,63 ± 0,05
6,63	0,559678	9,102019	100	-20	0,58 ± 0,10
7,00	1,189215	9,645091	100	0,137782	1,19 ± 0,03
7,44	1,753529	4,753075	100	0	1,75 ± 0,27
7,55	3,022734	7,646771	100	0	3,02 ± 0,32
7,85	3,702968	13,28238	100	10,30267	3,64 ± 0,14
8,14	5,760931	8,267999	100	0	5,76 ± 2,98

<sup>1</sup> HILL-Funktion:  $EC50 (\mu\text{mol/L}) = (X50 \cdot \text{Potenz}((1/((\text{Max}-\text{Min})/(\text{Effekt}-\text{Min}))-1));(1/P)))$

Trägt man die ermittelten EC50 gegen den pH-Wert auf, ist ein gerichteter Zusammenhang zu erkennen: eine pH-Wert Differenz um eine Einheit entspricht einer Änderung der Toxizität um das 4-fache (Abb. 21). Die funktionale Beschreibung der pH-abhängigen Toxizität von TCP (Abb. 21) mit

$$\text{EC50 } (\mu\text{mol/L}) = 0,00007e^{1,3933 \text{ pH}}; r^2 = 0,9794 \quad [\text{Gl. 11}]$$

erlaubt die Berechnung der Toxizität von 2,4,5-Chlorphenol für einen beliebigen pH-Wert innerhalb des getesteten Bereiches. Dies schafft die Grundlage für die Berechnung der Mischungstoxizität bei veränderten pH-Bedingungen unter Berücksichtigung der zu erwartenden Toxizität von TCP in der Mischung.

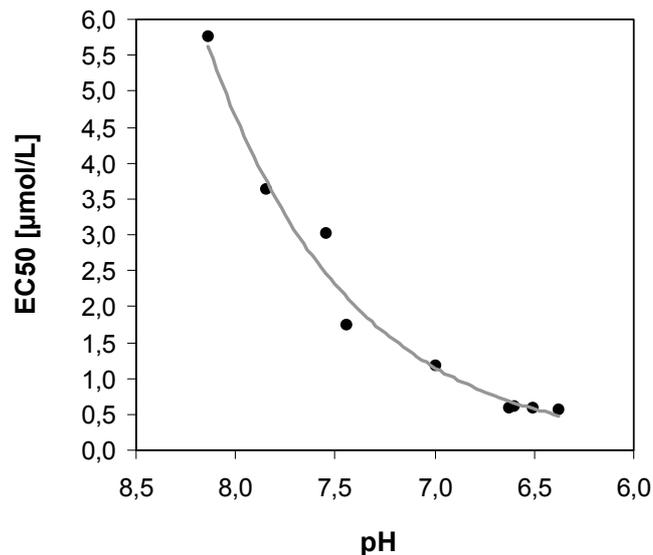


Abb. 21: Toxizität von 2,4,5-Trichlorphenol in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die Beziehung wird durch die angegebene exponentielle Funktion (—) sehr gut beschrieben.

### 3.3.2 Einfluß des pH-Wertes auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung von Kombinationswirkungen

Die für die ionogene Mischungskomponente 2,4,5-Trichlorphenol (TCP) charakterisierte pH-abhängige Toxizität (Kapitel 3.3.1) läßt erwarten, daß der Milieufaktor pH ebenfalls die *Intensität* der Kombinationswirkung der multiplen Mischung beeinflusst. Welche Relevanz der Milieufaktor pH für die *Vorhersagbarkeit* und *Beurteilung* der Kombinationswirkung der multiplen Mischung hat, ist allerdings unklar. Die diesbezügliche Relevanz des pH-Wertes wurde geprüft, indem die Mischung bei einem ins Alkalische verschobenen pH-Wert von 7,5 erneut getestet und die bei diesem pH-Wert veränderte Toxizität von TCP bei der Berechnung der nach beiden Konzepten, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, zu erwartenden Mischungstoxizität berücksichtigt wurde. Dabei lag die multiple Mischung in einer Gesamtkonzentration vor (667,7  $\mu\text{mol/L}$ ), die der Summe der NOECs der Komponenten als Einzelstoffe entspricht (NOEC-Design). Vor Testbeginn wurde der pH-Wert der Gemischlösung mit 1  $\mu\text{M}$  NaOH und 1,9 mM  $\text{NaHCO}_3$  eingestellt. Zur Berechnung des Effektes, den TCP bei pH 7,5 in der Konzentration erzeugt, mit der die Komponente in der Mischung vorliegt (NOEC), wird die unter Standardbedingungen ermittelte Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Trichlorphenol um einen Faktor entlang der Abszisse verschoben, welcher der Differenz der EC50 bei pH 7,0 und pH 7,5 entspricht (Abb. 22).

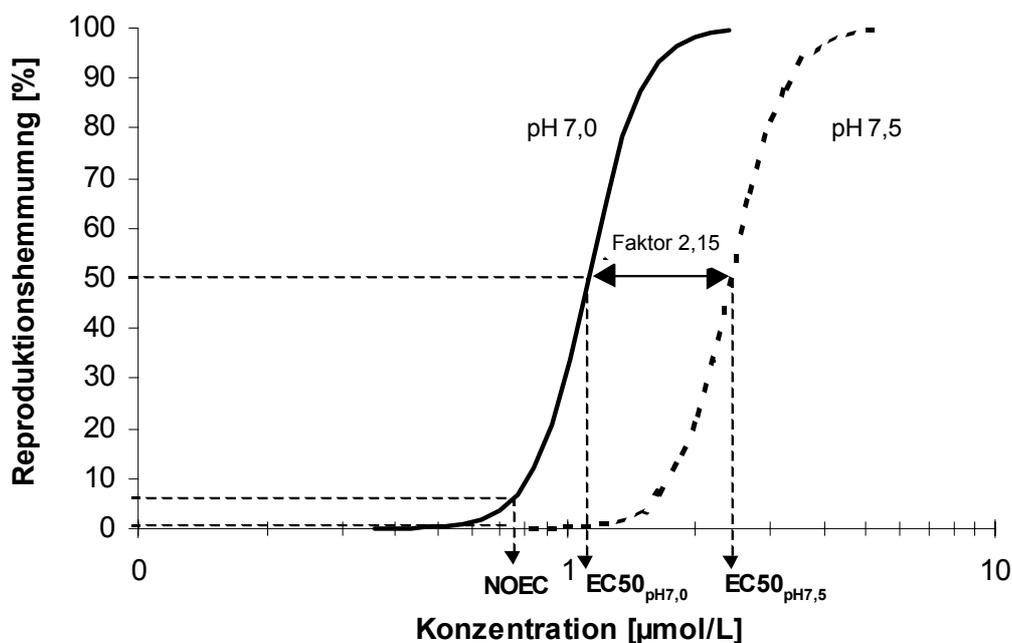


Abb. 22: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von 2,4,5-Trichlorphenol für pH 7, modelliert auf der Basis experimentell ermittelter Daten der Einzelstofftestung, und für pH 7,5, modelliert auf der Basis berechneter Werte.

Die Differenz der EC50 bei pH 7,0 und pH 7,5 wird mit Hilfe des Algorithmus kalkuliert, der den quantitativen Zusammenhang zwischen der Toxizität von TCP und dem pH-Wert des Milieus beschreibt (Gl. 11 und Abb. 21, Kapitel 3.3.1). Für die so berechnete Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Trichlorphenol bei pH 7,5 wird der bei der NOEC (0,795 µmol/L) generierte Effekt regressionsanalytisch geschätzt. Dieser liegt mit 0,05 % deutlich unterhalb der Wirkung, die TCP bei der selben Konzentration bei pH 7 im Einzelstoff-Standardtest erzeugt (8,5 %; vgl. Abb. 13, Kapitel 3.2.1).

Unter Berücksichtigung der bei pH 7,5 vergleichsweise niedrigeren Toxizität von TCP ist für die Mischung bei diesem pH-Wert nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG mit 55,1% auch ein etwas niedrigerer Effekt zu erwarten als bei Anwendung des Standardtestprotokolls (58% bei pH 6,9) (Abb. 23). Nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT hingegen ist der prognostizierte Mischungseffekt mit 100% für beide pH-Werte identisch (Abb. 23 und Abb. 17, Kapitel 3.2.2). Der bei pH 7,5 beobachtete Effekt der Mischung ist mit 63,9% (Abb. 23) gegenüber dem bei pH 6,9 experimentell ermittelten Effekt (87,5%, Abb. 17) allerdings deutlich reduziert.

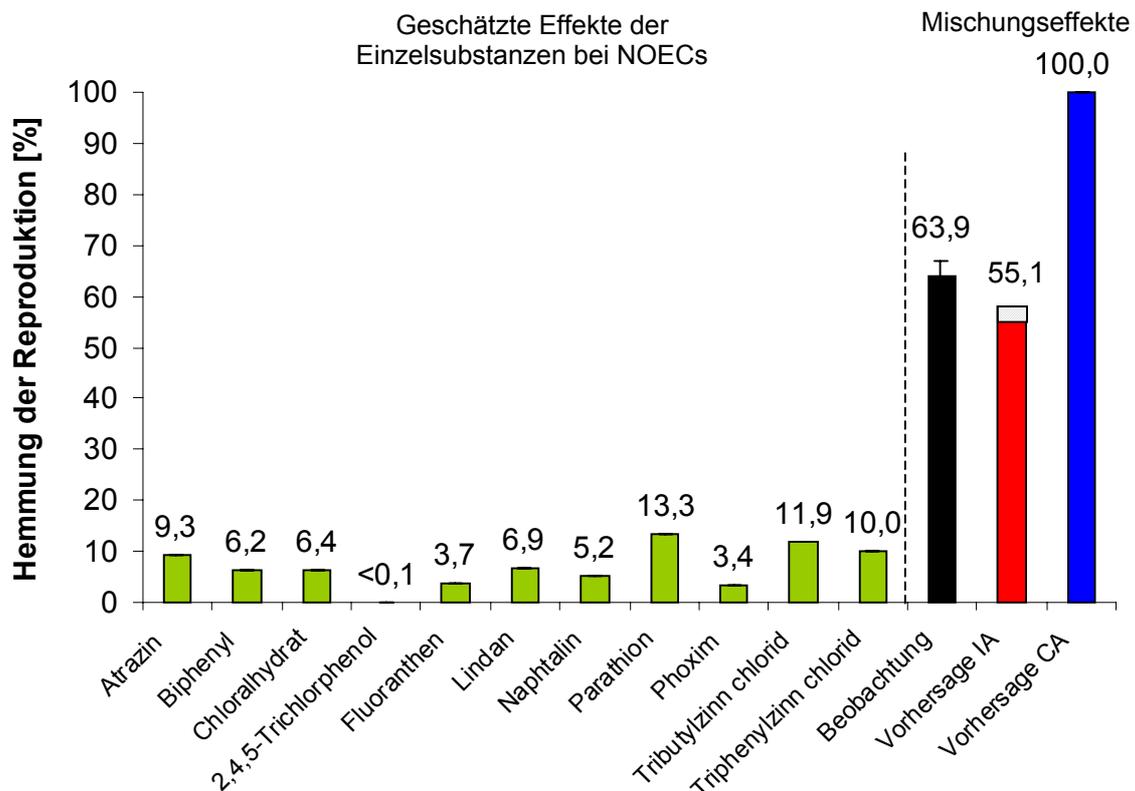


Abb. 23: Bei pH 7,5 beobachtete und nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT (CA) und UNABHÄNGIGER WIRKUNG (IA) prognostizierte Kombinationswirkung der multiplen Mischung im NOEC-Design. Zusätzlich sind die Effekte angegeben, die die Komponenten als Einzelstoffe bei den Konzentrationen generieren, mit denen sie in der Mischung vorliegen.

Zusammengenommen ergeben die Befunde für pH 6,9 und 7,5, daß die beobachteten Mischungseffekte mit verschiedenen Konzepten vorhergesagt und beurteilt werden können: Während bei pH 6,9 die Beobachtung besser mit der Prognose nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT übereinstimmt, wird die bei pH 7,5 beobachtete Mischungstoxizität präziser nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagt. Bezogen auf die Vorhersage nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT könnte die beobachtete Kombinationswirkung der selben Mischung bei pH 7,5 als Antagonismus, bei pH 6,9 unter Bezug auf die Vorhersage nach UNABHÄNGIGE WIRKUNG hingegen als Synergismus interpretiert werden.

Diese in Abhängigkeit des pH-Wertes entgegengesetzte Beurteilung und Vorhersagbarkeit der Kombinationswirkung derselben Mischung löst sich auf, wenn die unter Anwendung des Standardtestprotokolls ermittelte Kombinationswirkung unter Berücksichtigung der tatsächlichen pH-Bedingungen und der pH-abhängigen Toxizität von TCP reanalysiert wird. Denn bei einer nur geringen Abweichung des pH-Wertes um 0,3 Einheiten vom üblicherweise während des Tests vorliegenden pH-Wertes von 6,9 erzeugt TCP in der Konzentration, mit der die Substanz in der Mischung vorliegt, keinen Effekt von 8,5%, sondern von 74% (Abb. 24).

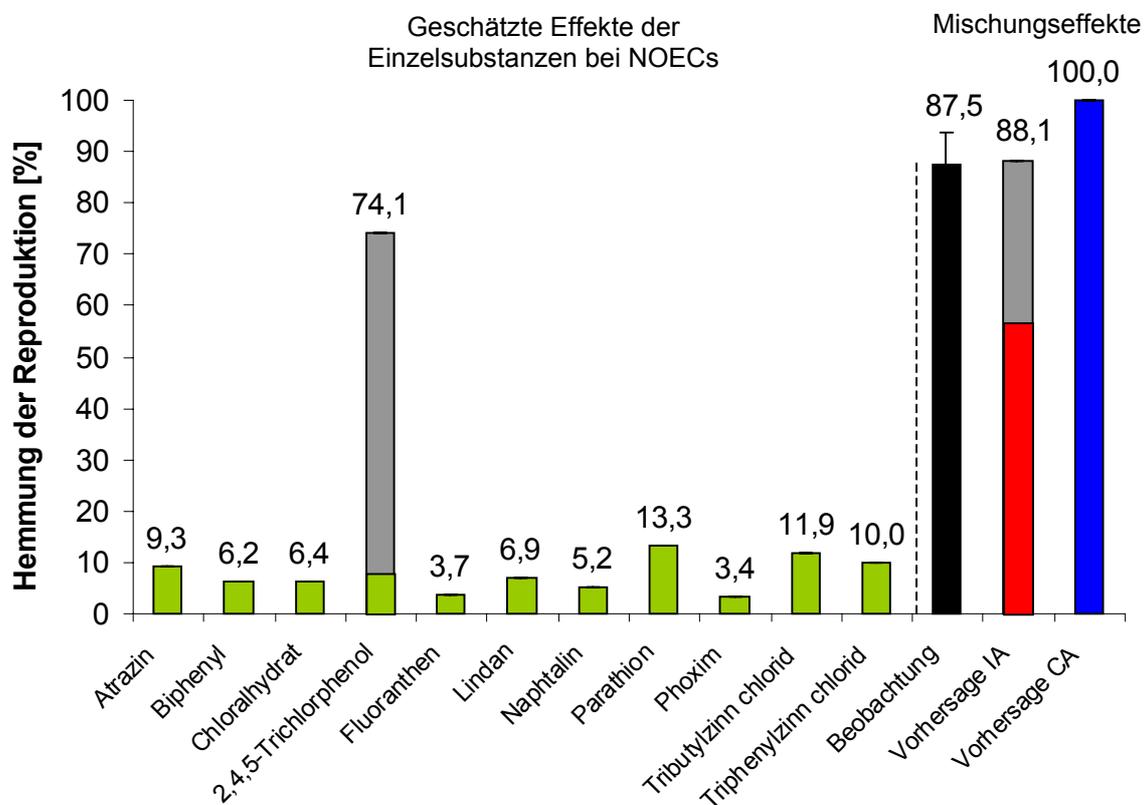


Abb. 24: Bei einem tatsächlichen pH-Wert von 6,6 beobachtete Kombinationswirkung unter Anwendung des Standardtestprotokolls und die unter Berücksichtigung der pH-abhängigen Toxizität von TCP reanalytierte Erwartung nach Konzentrationsadditivität (CA) und Unabhängiger Wirkung (IA) der multiplen Mischung im NOEC-Design. Zusätzlich sind die Effekte angegeben, die die Komponenten als Einzelstoffe bei den Konzentrationen generieren, mit denen sie in der Mischung vorliegen.

Unter Berücksichtigung dieses erhöhten Effektes von TCP bleibt die rück-berechnete Erwartung nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT unverändert, während die Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG dann 88,1% beträgt (Abb. 24).

Im Gegensatz zur Beurteilung der Kombinationswirkung bei Ignoranz der tatsächlichen pH-Bedingungen und der pH-abhängigen Toxizität von TCP, ist die bei Anwendung des Standardtestprotokolls beobachtete Mischungstoxizität in fast perfekter Übereinstimmung mit der reanalysierten Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG.

Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen und deren Reanalyse zeigen nicht nur, daß der pH-Wert über die pH-abhängige Toxizität von TCP einen deutlichen Einfluß auf die *Intensität* der Kombinationswirkung der multiplen Mischung hat, sondern außerdem auf deren *Vorhersagbarkeit* und *Beurteilung*. Mischungskomponenten mit pKs-Werten, die für das pH-Fenster des verwendeten Testprotokolls relevant sind, sollten daher auf ihre pH-abhängige Toxizität untersucht und diese charakterisiert werden. Die Berücksichtigung der pH-abhängigen Toxizität dieser Substanzen bei der Berechnung der zu erwartenden Mischungstoxizität kann zu einer deutlichen Verbesserung der Validität der Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung des betreffenden Chemikaliengemisches führen.

### 3.3.3 Zu den Ursachen pH-Wert-abhängiger Toxizität ionogener Substanzen

Ionogene Substanzen können nicht nur als Einzelsubstanzen, sondern auch als binäre Mischungen aus dissoziierter und undissoziierter Form verstanden werden, deren Mengen und damit deren Mischungsverhältnis nach Hendersson-Hasselbalch über das Verhältnis zwischen pH-Wert des sie umgebenden Milieus und dem pKs-Wert der Substanz bestimmt wird:

$$f_u = \frac{1}{(10^{\text{pH} - \text{pK}_s} + 1)} \quad [\text{Gl. 12}]$$

$$f_i = \frac{1}{(10^{\text{pK}_s - \text{pH}} + 1)} \quad [\text{Gl. 13}]$$

Die beobachtete pH-abhängige Toxizität ionogener Substanzen wird nicht selten auf die alleinige Wirksamkeit der undissoziierten Form zurückgeführt (Kishino und Kobayashi, 1995). Theoretisch könnten aber ebenso beide Formen protonierbarer Chemikalien, sowohl die neutrale als auch die deprotonierte Form, zu einer Gesamtoxizität beitragen, allerdings in verschiedenen Maßen, abhängig von intrinsischen Eigenschaften bezüglich Toxikokinetik und Toxikodynamik (Schüürmann, 1998) und den Mengen der undissoziierten ( $f_u$ ) und der dissoziierten Fraktion ( $f_i$ ).

Zur Prüfung der Frage, ob ausschließlich die undissoziierte Komponente für die pH-abhängige Toxizität ionogener Substanzen verantwortlich zeichnet oder ob beide Formen durch ein konzentrationsadditives Zusammenwirken die beobachtete Gesamtoxizität bewirken, ist die pH-abhängige Toxizität von 7 ionogenen Chlorphenolen mit pKs-Werten von 4,7 bis 9,2 untersucht worden. Für jede Substanz wurden Konzentrations-Wirkungs-Analysen bei mindestens 3 pH-Werten (typischerweise 6,4, 7,0 und 7,9) durchgeführt und die EC50 jeweils regressionsanalytisch geschätzt (Tab. 21). Wie aufgrund von Literaturdaten (Könemann und Musch, 1981; Kishino und Kobayashi, 1995; Schüürmann, 1998) zu erwarten war, zeigen alle Substanzen mit abnehmenden pH-Werten eine Zunahme ihrer Toxizität (Tab. 21).

Tab. 21: Algentoxizitäten (EC50) von 7 Chlorphenolen bei jeweils mindestens 3 pH-Werten sowie die zur regressionsanalytischen Schätzung der EC50-Werte verwendeten Modelle und deren Regressionsparameter. Zusätzlich sind die Anteile der dissoziierten und undissoziierten Fraktion der Substanzen (fu, fi) und angegeben.

Substanz	pKs <sup>1</sup>	pH	fu [%]	fi [%]	EC50 ± 95% CI [µmol/L]	Regressions- Modell <sup>2</sup>	Regressionsparameter			
							A	B	C	D
3-Monochlorphenol	8,9	6,46	99,6	0,4	114,95 ± 23,20	Hill	14,74		-1,13	8,99
		7,00	98,8	1,2	125,60 ± 5,32	Hill	16,05		-2,29	7,39
		7,93	90,4	9,6	127,01 ± 40,36	Hill	15,15		-24,31	5,28
4-Monochlorphenol	9,2	6,38	99,8	0,2	380,90 ± 35,46	Logit	48,97	0,13	0,00	
		7,00	99,4	0,6	377,06 ± 22,34	Logit	48,48	0,09	0,00	
		7,96	94,6	5,4	407,71 ± 11,40	Logit	52,42	0,09	0,00	
2,4-Dichlorphenol	7,8	6,46	95,6	4,4	27,50 ± 4,51	Logit	4,60	0,88	4,99	
		7,00	86,3	13,7	26,55 ± 0,99	Logit	4,33	1,20	0,00	
		7,87	45,8	54,2	35,58	Logit	5,80	1,05	1,32	
3,5-Dichlorphenol	8,1	6,40	98,0	2,0	5,10 ± 1,44	Logit	0,87	11,29	16,23	
		7,00	92,6	7,4	4,96 ± 0,11	Logit	0,80	14,05	-4,98	
		7,99	56,1	43,9	6,21 ± 0,35	Hill	1,00		-8,82	19,34
2,4,5-Trichlorphenol	6,9	6,38	76,9	23,1	0,57 ± 0,03	Hill	0,56		-1,96	9,68
		6,51	71,1	28,9	0,60 ± 0,06	Hill	0,60		0	5,66
		6,60	66,6	33,4	0,63 ± 0,05	Hill	0,63		0	6,04
		6,63	65,1	34,9	0,58 ± 0,10	Hill	0,56		-20	9,10
		7,00	44,3	55,7	1,19 ± 0,03	Hill	0,23		0,14	9,65
		7,44	22,4	77,6	1,75 ± 0,27	Hill	1,75		0	4,75
		7,55	18,3	81,7	3,02 ± 0,32	Hill	3,02		0	7,65
		7,85	10,2	89,8	3,64 ± 0,14	Hill	3,70		10,30	13,28
8,14	5,4	94,6	5,76 ± 2,98	Hill	5,76		0	8,27		
2,4,6-Trichlorphenol	6,0	6,42	27,4	72,6	3,19 ± 0,87	Hill	0,61		-4,03	2,01
		7,00	9,1	90,9	6,04 ± 0,44	Hill	1,19		0,00	2,1
		7,99	1,0	99,0	42,54 ± 9,97	Hill	8,40		0,00	1,93
Pentachlorphenol	4,7	6,39	2,0	98,0	0,11 ± 0,005	Hill	0,03		13,34	2,44
		7,00	0,5	99,5	0,42 ± 0,12	Hill	0,09		-18,13	1,47
		7,80	0,1	99,9	1,12 ± 0,47	Hill	0,27		-18,05	2,90

<sup>1</sup> aus: Kishino und Kobayashi, 1995

<sup>2</sup> Logit:  $EC50 \text{ (mg/L)} = (A - (1/B * \ln((100-C)/(50-C)-1)))$

Hill :  $EC50 \text{ (mg/L)} = (A * \text{POTENZ}((1/((100-C)/(50-C)-1));(1/D))))$ ; für 2,4,5-Trichlorphenol in µmol/L.

ALLEINIGE WIRKSAMKEIT DER UNDISOZIIERTEN KOMPONENTE ?

Unter Verwendung von Gl. 12 und Gl. 13 können die Konzentrationen der dissoziierten sowie der undissoziierten Spezies,  $c(fi)$  und  $c(fu)$ , bei gegebenem pH-Wert für die beobachteten EC50 berechnet werden (nach Schüürmann, 1998):

$$c(fu) = fu \times EC50 \quad [Gl. 14]$$

$$c(fi) = fi \times EC50 \quad [Gl. 15]$$

Die Ergebnisse sind in Tab. 22 dargestellt. Bei alleiniger Wirksamkeit der undissoziierten Spezies einer ionogenen Substanz sollte derselbe Effekt auch bei unterschiedlichen pH-Werten stets von derselben Konzentration der effektiven Komponente erzielt werden. Trägt man  $c(fu)$  gegen den pH-Wert auf, ist eine Regressionsgerade zu erwarten, die parallel zur Abszisse verläuft.

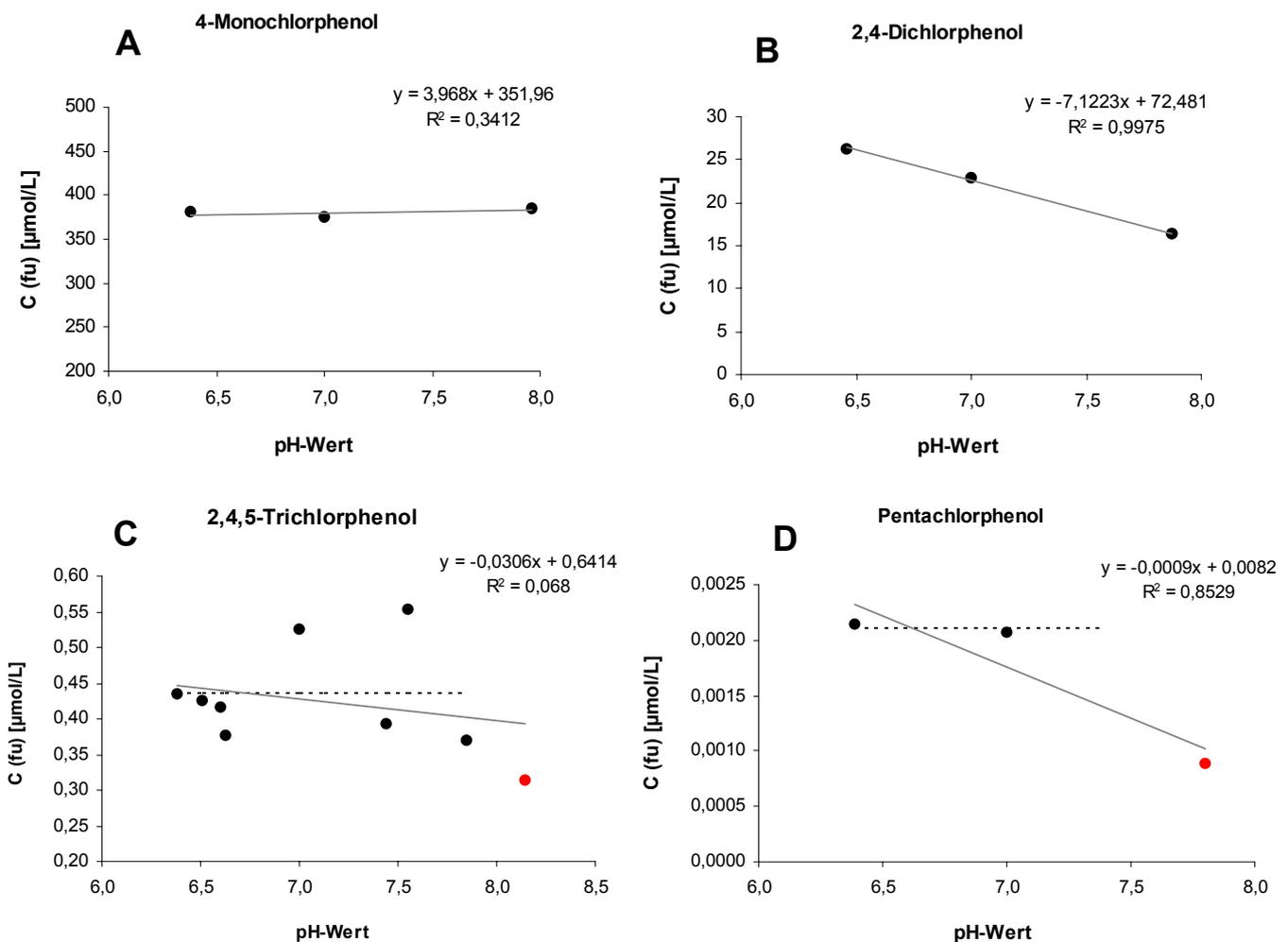


Abb. 25: Die Konzentration der undissoziierten Spezies,  $c(fu)$ , als Teil der Gesamtkonzentration aus  $c(fu)$  und  $c(fi)$ , bei der die Substanz einen Gesamteffekt von 50% erzielt, aufgetragen gegen verschiedene pH-Werte. Exemplarisch sind die Ergebnisse für 4-Monochlorphenol, 2,4-Dichlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol und Pentachlorphenol dargestellt. Durchgezogene Linien bezeichnen Regressionsgeraden, gestrichelte Linien berechnete Mittelwerte für ausgesuchte  $c(fu)$ .

### 3.3 Abhängigkeit der Kombinationswirkung vom Milieufaktor pH

Tab. 22: Konzentrationen der undissoziierten Komponente (c(fu)) für ermittelten EC50 von 7 Chlorphenolen, deren SD bezogen auf mittlere c(fu,) sowie die Parameter der linearen Regression bei Auftragung von c(fu) gegen die pH.-Werte (m, b, r<sup>2</sup>). Ferner sind die Algentoxizitäten (EC50) der 7 Chlorphenole bei jeweils mindestens 3 pH-Werten sowie die jeweiligen Anteile der dissoziierten und undissoziierten Fraktion der Substanzen (fu, fi) angegeben.

Substanz	pKs <sup>1</sup>	pH	fu [%]	fi [%]	EC50 ± 95% CI [µmol/L]	c(fu) [µmol/L]	SD / Ø	Regressionsparameter <sup>2</sup>		
								m	b	r <sup>2</sup>
3-Monochlorphenol	8,9	6,46	99,6	0,4	114,95 ± 23,20	114,5	0,05	-0,90	124,2	0,0153
		7,00	98,8	1,2	125,60 ± 5,32	124,0				
		7,93	90,4	9,6	127,01 ± 40,36	114,8				
		Ø			117,8 ± 5,41					
4-Monochlorphenol	9,2	6,38	99,8	0,2	380,90 ± 35,46	380,3	0,01	3,97	352,0	0,3412
		7,00	99,4	0,6	377,06 ± 22,34	374,7				
		7,96	94,6	5,4	407,71 ± 11,40	385,5				
		Ø			380,2 ± 5,41					
2,4-Dichlorphenol	7,8	6,46	95,6	4,4	27,50 ± 4,51	26,3	0,23	-7,12	72,5	0,9975
		7,00	86,3	13,7	26,55 ± 0,99	22,9				
		7,87	45,8	54,2	35,58	16,3				
		Ø			21,8 ± 5,09					
3,5-Dichlorphenol	8,1	6,40	98,0	2,0	5,10 ± 1,44	5,0	0,18	-0,97	11,3	0,9848
		7,00	92,6	7,4	4,96 ± 0,11	4,6				
		7,99	56,1	43,9	6,21 ± 0,35	3,5				
		Ø			4,4 ± 0,78					
2,4,5-Trichlorphenol	6,9	6,38	76,9	23,1	0,57 ± 0,03	0,43	0,18	-0,031	0,6	0,0585
		6,51	71,1	28,9	0,60 ± 0,06	0,43				
		6,60	66,6	33,4	0,63 ± 0,05	0,42				
		6,63	65,1	34,9	0,58 ± 0,10	0,38				
		7,00	44,3	55,7	1,19 ± 0,03	0,53				
		7,44	22,4	77,6	1,75 ± 0,27	0,39				
		7,55	18,3	81,7	3,02 ± 0,32	0,55				
		7,85	10,2	89,8	3,64 ± 0,14	0,37				
		8,14	5,4	94,6	5,76 ± 2,98	0,31				
Ø			0,42 ± 0,08							
2,4,6-Trichlorphenol	6,0	6,42	27,4	72,6	3,19 ± 0,87	0,87	0,37	-0,26	2,5	0,8349
		7,00	9,1	90,9	6,04 ± 0,44	0,55				
		7,99	1,0	99,0	42,54 ± 9,97	0,43				
		Ø			0,62 ± 0,23					
Pentachlorphenol	4,7	6,39	2,0	98,0	0,11 ± 0,005	0,0022	0,41	-0,0009	0,008	0,8529
		7,00	0,5	99,5	0,42 ± 0,12	0,0021				
		7,80	0,1	99,9	1,12 ± 0,47	0,0009				
		Ø			0,0017 ± 0,00071					

1 aus: Kishino und Kobayashi, 1995

2 Parameter der Regressionsgleichung : c(fu) = m x pH + b

Die lineare Korrelationsanalyse ergibt für die untersuchten Monochlorphenole mit 0,0153 (3-Monochlorphenol) und 0,3412 (4-Monochlorphenol) nur geringe  $r^2$  (Tab. 22), die gegen eine Abhängigkeit der  $c(fu)$  vom pH-Wert sprechen. Die vergleichsweise niedrigen Standardabweichungen der Mittelwerte für  $c(fu)$  von 3-Monochlorphenol (5% des Mittelwertes) und 4-Monochlorphenol (1 % des Mittelwertes) sind zusätzliche Indizien dafür, daß  $c(fu)$  bei den verschiedenen pH-Werten konstant ist und daß die Toxizität der Substanz für den untersuchten pH-Bereich ausschließlich auf die Wirksamkeit der undissoziierten Komponente zurückzuführen ist.

Die hingegen vergleichsweise guten Korrelationen zwischen  $c(fu)$  und dem pH-Wert für 2,4-Dichlorphenol ( $r^2=0,9975$ ), 3,5-Dichlorphenol ( $r^2=0,9848$ ) und 2,4,6-Trichlorphenol ( $r^2=0,8349$ ) sprechen bei diesen Substanzen gegen konstante Konzentrationen der undissoziierten Form bei verschiedenen pH-Werten (Tab. 22). Die Standardabweichungen der  $c(fu)$ , die mit 18 bis 37 % der mittleren  $c(fu)$  der Substanzen im Vergleich zu den entsprechenden Standardabweichungen der Monochlorphenole hoch sind, sprechen ebenfalls dagegen, daß bei den verschiedenen pH-Werten die undissoziierte Form in den selben Konzentration vorliegt. Insgesamt sprechen die Ergebnisse für 2,4-Dichlorphenol, 3,5-Dichlorphenol und 2,4,6-Trichlorphenol gegen die Annahme, daß die Toxizität dieser Substanzen ausschließlich durch die Wirksamkeit der undissoziierten Spezies erzeugt wird.

Für 2,4,5-Trichlorphenol und Pentachlorphenol sind die Regressionsgeraden der Abb. 25, C und D, nicht eindeutig als Gerade mit parallelem Verlauf zur pH-Achse oder als abfallende Gerade zu interpretieren. Die geringe negative Steigung der Regressionsgerade und die vergleichsweise geringe Korrelation ( $r^2=0,068$ ) sprechen im Fall von 2,4,5-Trichlorphenol eher gegen eine Interpretation im Sinne einer abfallenden Geraden. Allerdings weist die gemittelte  $c(fu)$  eine im Vergleich zu den Monochlorphenolen eher hohe Standardabweichung (18% des Mittelwertes) auf. Diese hohe Standardabweichung ist offensichtlich auf die für den gesamten pH-Bereich hohe und unregelmäßige Streuung der EC50-Werte zurückzuführen (Tab. 22), weshalb die Standardabweichung kein Indiz gegen das eventuelle Vorliegen konstanter Konzentrationen der undissoziierten Spezies bei den verschiedenen pH-Werten darstellt. Für Pentachlorphenol ist der Korrelationskoeffizient,  $r^2$ , mit einem Wert von 0,8529 ein Indiz für das Bestehen eines gerichteten, negativen Zusammenhanges zwischen  $c(fu)$  und pH-Wert. Die Standardabweichung der mittleren  $c(fu)$ , die mit 41% (bezogen auf den Mittelwert) die höchste unter den Substanzen darstellt, spricht nicht für eine parallel zur Abszisse verlaufende Gerade. Diese hohe Standardabweichung ist allerdings wesentlich auf die auffällig geringe Konzentration an  $f_u$  (0,0009  $\mu\text{mol/L}$ ) bei dem höchsten pH-Wert (pH 7,8) zurückzuführen, die deutlich von den ansonsten kaum

divergierenden  $c(fu)$  (0,0021 und 0,0022  $\mu\text{mol/L}$ ) bei den beiden niedrigeren pH-Werten (7,0 und 6,39) abweicht. Für Pentachlorphenol wie auch für 2,4,5-Trichlorphenol könnte der Zusammenhang zwischen  $c(fu)$  und dem pH-Wert (Abb. 25, C und D) auch bis zu einem bestimmten pH-Wert als parallel zur Abszisse verlaufende Gerade beschrieben werden, die erst bei höheren pH-Werten in Richtung der pH-Achse abfällt. Zur Illustration dieser Interpretation ist für beide Substanzen in Abb. 25, C und D, eine parallel zur pH-Achse verlaufende Gerade, als gestrichelte Linie angedeutet, die die mittlere  $c(fu)$  ohne die jeweils niedrigste  $c(fu)$  beim jeweils höchsten pH-Wert darstellt.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse nur für die untersuchten Monochlorphenole eindeutig für eine konstante  $EC_{50}$  der undissoziierten Phenolform bei verschiedenen pH-Werten und damit für die undissoziierte Spezies als die die Gesamtwirkung bestimmende Komponente der als binäres Gemisch zu betrachtenden ionogenen Substanzen. Für die anderen untersuchten Chlorphenole können aus den vorliegenden Ergebnissen keine eindeutigen Schlüsse hinsichtlich der undissoziierten Form als einzig effektiver Komponente gezogen werden. Dies gilt auch für die Substanzen, deren Ergebnisse deutlich für eine Abnahme der Konzentration an undissoziierter Spezies (als Teil der  $EC_{50}$ ) mit zunehmendem pH-Wert sprechen, was als Hinweis auf eine Beteiligung der dissoziierten Komponente an der Gesamtwirkung der Substanz gewertet werden könnte. Denn eine pH-Wert-abhängige Abnahme von  $c(fu)$  könnte ebenso auf einen Einfluß des pH-Wertes auf die Empfindlichkeit der Algen zurückzuführen sein, da für zunehmende pH-Werte eine Abnahme der Algenreproduktion beobachtet wurde (Kap. 2.1, Abb. 4).

## pH-WERT ABHÄNGIGE TOXIZITÄT NICHT-IONOGENER SUBSTANZEN

Da die Algenvermehrung mit zunehmendem pH-Wert des Mediums reduziert ist (Abb. 4, Kapitel 2.1), könnte die für einige ionogene Substanzen mit zunehmendem pH-Wert für die EC50 beobachtete Abnahme der Konzentration an undissoziierter Spezies ( $c(fu)$ ) nicht ausschließlich auf einen Kombinationseffekt durch zusätzliche Beteiligung der dissoziierten Komponente zurückzuführen sein, sondern ebenso auf den Einfluß des externen "pH-Stresses" auf die Reproduktionsfähigkeit der Algen. Zur Prüfung dieser Überlegung wurden nicht-ionogene Substanzen auf eine eventuelle pH-Abhängigkeit ihrer Toxizität untersucht.

Für die Substanzen Parathion, Phoxim und Atrazin wurden Konzentrations-Wirkungs-Analysen bei mindestens 3 pH-Werten durchgeführt, die zwischen pH 5,5 und pH 8,1 lagen. Eine Übersicht der EC50 ist in Tabelle 23 gegeben. Exemplarisch für die ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen wird das Ergebnis für Phoxim gezeigt (Abb. 26). Obwohl für die EC50 bei den verschiedenen pH-Werten eine Abweichung beobachtet werden konnte, ist in dieser Darstellung kein regelhafter Zusammenhang erkennbar (Abb. 26).

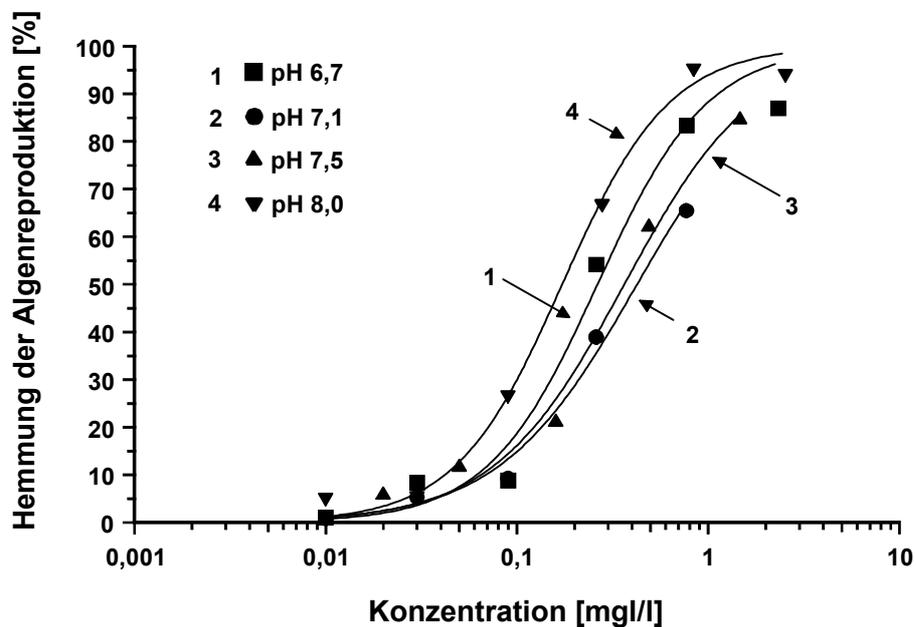


Abb. 26: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für Phoxim bei 4 pH-Werten.

Trägt man die für die Substanzen regressionsanalytisch geschätzten EC50 gegen den pH-Wert auf, ergibt die Regression für Phoxim und Parathion allerdings eine leicht abfallende Gerade, die auf eine Zunahme der Toxizität mit zunehmendem pH-Wert hindeutet (Abb. 27). Die Anzahl der Datenpunkte und die niedrigen Korrelationskoeffizienten ( $r^2=0,1687$  für Phoxim und  $r^2=0,3569$  für Parathion) erschweren jedoch eine abschließende Beurteilung.

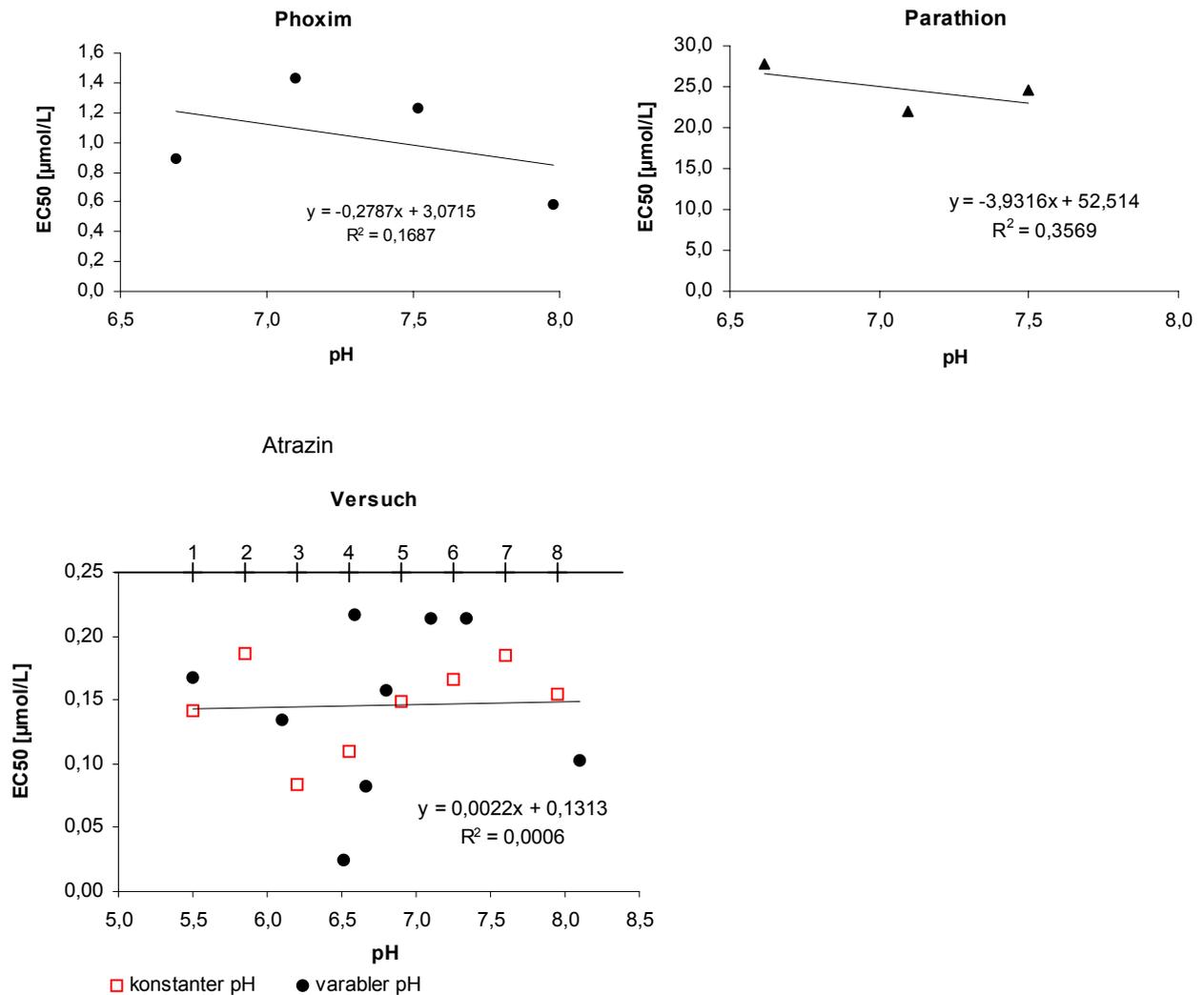


Abb. 27: EC50 von Phoxim, Parathion und Atrazin bei verschiedenen pH-Werten des Testmediums. Neben den EC50 sind zusätzlich die Regressionen angegeben. Für Atrazin sind außerdem die in 8 unabhängigen Versuchen bei konstantem pH-Wert ermittelten EC50-Werte gezeigt.

Für Atrazin wurden bei insgesamt 9 verschiedenen pH-Werten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für einen Bereich von 5,5 bis 8,3 aufgenommen (Tab. 23). Die vergleichsweise hohe Streuung der EC50-Werte, aufgetragen gegen den pH-Wert, führt auch hier zu keiner aussagefähigen Regression ( $r^2 = 0,0006$ ) (Abb. 27). Eine Zunahme der Toxizität von Atrazin

durch einen direkten Einfluß des pH-Wertes auf die Reproduktionsfähigkeit der Algen ist aus dieser Regression nicht abzuleiten. Ein Vergleich der für Atrazin bei verschiedenen pH-Werten ermittelten EC50-Werte mit Werten, die von anderen Experimentatoren im selben Labor in 8 unabhängigen Versuchen bei konstanten pH-Bedingungen ermittelt wurden, zeigt, daß die jeweiligen Mittelwerte fast identisch sind (Abb. 27, 28). Die Standardabweichung der EC50-Werte für Atrazin bei verschiedenen pH-Werten ist mit 0,067 allerdings fast doppelt so hoch wie für die bei konstantem pH-Wert beobachteten EC50-Werte (0,036) (Abb. 28, Tab. 23, 24). Dieser Unterschied ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß die Algenreproduktion von der pH-Wert-abhängigen Verfügbarkeit der CO<sub>2</sub>-Quelle Carbonat beeinflusst wird. Denn bei z. B. pH 6,5 liegt Carbonat ( $pK_{s_{H_2CO_3}} = 6,5$ ) zu 50 % als CO<sub>2</sub> vor, was in Abhängigkeit der Handhabung während des Testansatzes in unterschiedlichen Maßen entweichen könnte.

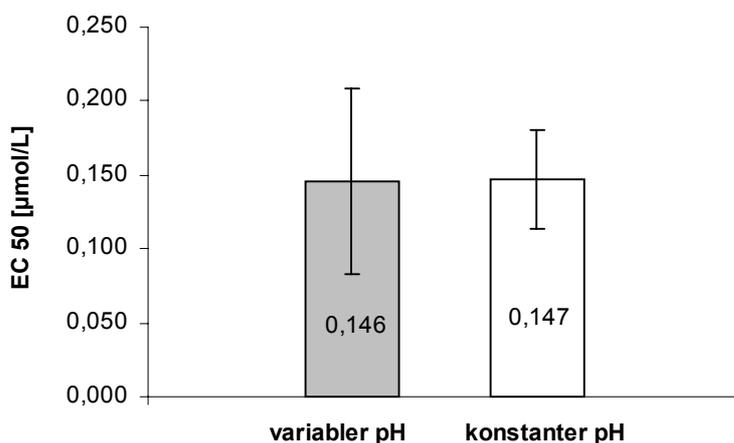


Abb. 28: Vergleich der EC50 Mittelwerte für Atrazin, ermittelt unter variablen und unter konstanten pH-Bedingungen.

Tab. 23: Regressionsanalytisch geschätzte EC50 von Atrazin, Phoxim und Parathion bei verschiedenen pH-Werten sowie verwendete Regressionsmodelle und –parameter.

Substanz	pH	Regressions- Modell <sup>1</sup>	Regressionsparameter <sup>1</sup>			EC50 (µmol/L)
			A	B	C (x0 / y0)	
Atrazin	5,5	Logit	107,7	-1,5	0,045 / 5,1	0,167
	6,1	Logit	114,1	-1,3	0,037 / 0,7	0,134
	6,5	Hill	0,005	1,755		0,024
	6,6	Hill	0,047	1,954		0,217
	6,7	Box-Cox-Probit	2,46	0,87	-0,10	0,082
	6,8	Logit	97,9	-1,9	0,033 / -2,1	0,158
	7,1	Hill	0,046	2,325		0,214
	7,3	Hill	0,046	1,658		0,214
	8,1	Logit	105,2	-1,5	0,018 / -1,7	0,102
∅ 0,146 ± 0,067						
Phoxim	6,7	Hill	0,265	1,513		0,89
	7,1	Hill	0,427	1,206		1,43
	7,5	Hill	0,366	1,273		1,23
	8,0	Hill	0,173	1,555		0,58
∅ 1,03 ± 0,375						
Parathion	6,6	Logit	8,075	0,354		27,73
	7,1	Logit	6,383	0,493		21,91
	7,5	Logit	7,138	0,358		24,51
∅ 24,72 ± 2,911						

<sup>1</sup> Logit:  $EC50 (\mu\text{mol/L}) = y_0 + A \cdot \frac{\text{abs}((x/x_0)^{\text{abs}(B)})}{1 + (\text{abs}(x/x_0)^{\text{abs}(B)})}$

Hill :  $EC50 (\mu\text{mol/L}) = (A \cdot \text{Potenz}((1/((100/50)-1));(1/B))))$ ; Für Atrazin in mg/L.

Box-Cox-Probit:  $A = \theta_1, B = \theta_2, C = \theta_3$  (vgl. Abb. 29)

Tab. 24: Algentoxizität von Atrazin ermittelt in routinemäßiger Testung in unabhängigen Versuchsansätzen bei Standardbedingungen.

Versuchs- Ansatz	Regressionsparameter <sup>1</sup>		EC50 [µmol/L]
	A	B	
1	0,030	1,673	0,141
2	0,040	1,749	0,187
3	0,018	1,891	0,083
4	0,024	1,174	0,110
5	0,032	1,495	0,149
6	0,036	1,784	0,166
7	0,040	2,090	0,184
8	0,033	2,014	0,155
∅ 0,147 ± 0,036			

<sup>1</sup> Logit:  $EC50 (\text{mg/L}) = (A - (1/B \cdot \text{LN}((100/50)-1)))$

Obwohl die Ergebnisse insgesamt nicht eindeutig im Sinne eines Einflusses des pH-Wertes auf die Toxizität der untersuchten Substanzen interpretiert werden können, sind die abfallenden Regressionen für Phoxim und Parathion Indizien für einen solchen Einfluß. Für Atrazin hingegen kann eine Erhöhung der Toxizität mit zunehmendem pH nicht beobachtet werden. Aus einer biologischen Perspektive ist die Annahme plausibel, daß der Einfluß variierender externer pH-Werte auf die Reproduktionsfähigkeit der Algenzelle zu einer Erhöhung der Toxizität von Chemikalien führen kann. Untersuchungen zur pH-Wert-Homöostase der Süßwasseralgen *Chlorella pyrenoidosa* und *Scenedesmus quadricauda* zeigten, daß der intrazelluläre pH bei Werten zwischen 7 und 8 gehalten wird, wenn der pH-Wert des externen Milieus zwischen 3 und 9 variiert (Lane und Burris, 1981). Die in diesem Testsystem verwendete Alge *Scenedesmus vacuolatus* (früher *Chlorella fusca*) vermag den internen pH-Wert bei externen pH-Werten von 3 bis 10 bei 7,2 bis 7,8 zu halten (Küsel, 1990). Es ist vernünftig anzunehmen, daß die pH-Homöostase, wie andere physiologische Regulationsprozesse auch, einen Optimumbereich für bestimmte externe pH-Werte besitzt und die Fähigkeit zur Gegenregulation für extremere pH-Bereiche ab- und der schädliche Einfluß der pH-Werte auf die Algenzelle zunimmt. Daher ist weiter anzunehmen, daß die Sensitivität der Algenzelle für zusätzliche, schädigende Einflüsse wie die Wirkung toxischer Substanzen insbesondere in diesen extremen Bereichen der pH-Homöostase zunimmt. Folglich wäre eine erhöhte Toxizität einer Substanz nicht für das gesamte getestete pH-Fenster anzunehmen, sondern insbesondere für solche externen pH-Werte, die an die Grenzen der Algenzelle zur internen pH-Gegenregulation heranreichen. Bei kombiniertem Stress aus erhöhten (bzw. erniedrigten) externen pH-Werten einerseits und der toxischen Wirkung einer Substanz andererseits könnte dieser Schwellenwert, d. h. der externe pH-Wert, ab welchem ein solcher Kombinationseffekt beobachtet werden kann, abhängig sein von der Art und der Intensität des Zusammenwirkens der Substanz und des abiotischen Faktors. Da verschiedene Substanzen unterschiedliche Wirkungsweisen und Wirkintensitäten besitzen, könnte dieser Grenz-pH-Wert für verschiedene Substanzen unterschiedlich sein. Dies bedeutete auch, daß die beobachtete Toxizität einiger Substanzen, ionogen oder nicht-ionogen, für bestimmte pH-Wert Bereiche auf einem Kombinationseffekt aus der Wirkung des pH und der Wirkung der Substanz beruht, und für andere Substanzen nicht, je nach dem, ob dieser Kombinationseffekt in dem getesteten pH-Fenster relevant ist oder nicht. Dies könnte erklären, warum z. B. für Phoxim und Parathion eine erhöhte Toxizität bei höheren pH-Werten zu beobachten ist, nicht aber für Atrazin.

Ein Substanz-spezifisches Auftreten eines Kombinationseffektes aus pH-Wert und Wirkung der Substanz könnte ebenfalls erklären, warum für einige ionogene Substanzen wie z. B. 2,4-Dichlorphenol (Abb. 25, B) eine Abnahme der Konzentration an undissoziierter Spezies

(c(fu)) mit zunehmendem pH-Wert beobachtet wurde, für andere ionogene Substanzen, wie z. B. 4-Monochlorphenol (Abb. 25, A), hingegen nicht, und für wieder andere erst ab einem bestimmten pH-Wert bzw. für ein bestimmtes pH-Fenster (z. B. 2,4,5-Trichlorphenol, Pentachlorphenol, Abb. 25, B und C). Systematische Untersuchungen zu Kombinationswirkungen von Chemikalien und abiotischen Faktoren fehlen bisher völlig, weshalb die Beiträge beider Faktoren zum beobachteten Gesamteffekt weder qualitativ noch quantitativ beschrieben werden können. Für die untersuchten ionogenen Substanzen kann daher nicht abschließend beurteilt werden, ob die pH-abhängige Toxizität ausschließlich auf die Wirksamkeit der undissoziierten Phenolform zurückgeführt werden kann. Aufgrund der in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse könnte die beobachtete Gesamttoxizität der Chlorphenole ebensogut unter Annahme

- der Beteiligung der dissoziierten Komponente an der Gesamtwirkung der Substanz,
- eines externen "pH-Stresses" der Algenzellen zusätzlich zur alleinigen Wirkung der undissoziierten Spezies, oder
- eines Kombinationseffektes aus pH-Wert und der Wirkung der einen, der anderen oder aber beiden Spezies gemeinsam erklärt werden.

KONZENTRATIONSADDITIVITÄT VON DISSOZIIERTER UND UNDISSOZIIERTER FORM ?

Wesentliche Voraussetzung für die Analyse von Kombinationswirkungen von Chemikaliengemischen sind Informationen über die Toxizität der Einzelsubstanzen. Die Kombinations-Wirkungs-Analyse "binärer Gemische" aus protonierter und deprotonierter Spezies ionogener Substanzen wird daher insbesondere dadurch erschwert, daß die Toxizitäten der einzelnen Spezies experimentell nicht in jedem Fall isoliert ermittelt werden können.

Zur Untersuchung der Frage, ob der für die untersuchten ionogenen Substanzen bei verschiedenen pH-Werten beobachtete Gesamteffekt auf ein konzentrationsadditives Zusammenwirken der undissoziierten und der dissoziierten Form zurückgeführt werden kann, wird im Folgenden eine explizit für ionogene Stoffe publizierte Verfahrensweise zur Berechnung der Toxizitäten beider Spezies verwendet (Schüürmann, 1998, Könemann und Musch, 1981). Entsprechend Gl. 1 gilt bei konzentrationsadditiven Zusammenwirken beider Formen dissoziierbarer Substanzen (nach Schüürmann, 1998)

$$1 = \frac{c(\text{fu})}{\text{EC50u}} + \frac{c(\text{fi})}{\text{EC50i}} \quad [\text{Gl. 16}]$$

wobei  $c(\text{fu})$  und  $c(\text{fi})$  die Konzentrationen der Spezies in der "Mischung" darstellen und  $\text{EC50u}$  und  $\text{EC50i}$  die Konzentrationen beider Fraktionen, die allein den selben Effekt erzeugen wie die "Mischung" (50%).

Durch Einfügen von Gl. 14 und 15 in Gl. 16 und Umformungen erhält man

$$\frac{1}{\text{EC50}} = \frac{f_u}{\text{EC50u}} + \frac{f_i}{\text{EC50i}} \quad [\text{Gl. 17}]$$

und nach Ersetzen von  $f_u$  durch  $f_u = 1 - f_i$  und abermals Umformungen schließlich

$$\frac{1}{\text{EC50}} = \frac{1}{\text{EC50u}} + f_i \cdot \left( \frac{1}{\text{EC50i}} - \frac{1}{\text{EC50u}} \right) \quad [\text{Gl. 18}]$$

Die Toxizitäten der Phenol- und der Phenolatform,  $\text{EC50u}$  und  $\text{EC50i}$ , können mit Hilfe der erhaltenen Geradengleichung nach Auftragen von  $1/\text{EC50}$  für verschiedene pH-Werte gegen  $f_i$  aus Steigung und Schnittpunkt der linearen Regression berechnet werden. Ein Beispiel einer solchen Darstellung ist in Abb. 29 für 2,4,5-Trichlorphenol gegeben.

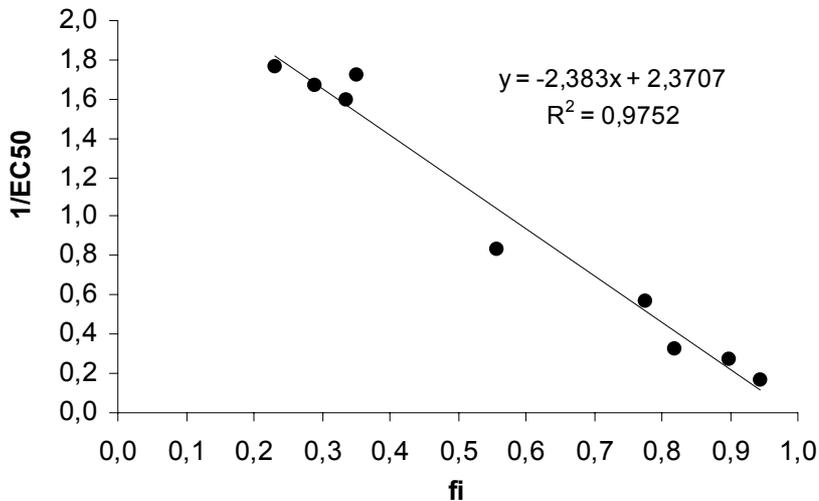


Abb. 29: Algentoxizität von 2,4,5-Trichlorphenol bei verschiedenen pH-Werten aufgetragen gegen den fraktionalen Teil der dissoziierten Form.

Die so für vollständige Protonation bzw. Ionisation der ionogenen Substanzen kalkulierten Toxizitäten beider Spezies wurden in einem weiteren Schritt zur Berechnung ihrer bei Konzentrationsadditivität für die verschiedenen pH-Werte zu erwartenden "Mischungstoxizität" verwendet. Die *berechneten* Toxizitäten der "binären Gemische" aus dissoziierter und undissoziierter Form wurden anschließend mit der für die verschiedenen pH-Werte *beobachteten* Toxizitäten der ionogenen Substanzen verglichen. Die Ergebnisse der entsprechenden Analyse sind in Tab. 25 dargestellt.

Die in einigen Fällen als negative Werte berechneten EC50i zeigen, daß der verwendete Ansatz zur Berechnung der Toxizitäten der dissoziierten Form (Tab. 25) limitiert ist. Die berechneten negativen EC50i beruhen auf einer nur sehr geringen Differenz zwischen den linearen Regressionsparametern "Achsenabschnitt" und "Steigung" und könnten auf die Varianz der regressionsanalytisch geschätzten EC50-Werte zurückzuführen sein. Wie die negativen EC50i zu bewerten sind bleibt allerdings unklar.

Der ebenfalls in Tab. 25 dargestellte Beitrag der Toxizität der undissoziierten bzw. dissoziierten Form zur experimentell ermittelten Gesamtoxizität, Beitrag(fu), wurde mit Hilfe von Gl. 19 berechnet (nach Schüürmann, 1998):

$$\text{Beitrag (fu) [\%]} = \frac{f_u}{EC_{50u}} \cdot EC_{50} \cdot 100 \quad [\text{Gl. 19}]$$

Für den Beitrag der dissoziierten Form gilt entsprechendes. Durch Einfügen von Gl. 14 in Gl. 19 erhält man

$$\text{Beitrag (fu) [\%]} = \frac{c(\text{fu})}{\text{EC50}_u} \cdot 100 \quad [\text{Gl. 20}]$$

In Gl. 20 wird der Toxizitätsbeitrag der undissoziierten Form zur beobachteten Gesamttoxizität ausgedrückt als Verhältnis zwischen der Konzentration der Spezies in der "Mischung",  $c(\text{fu})$ , die einen experimentell ermittelten Effekt von 50% erzeugt, und der berechneten Konzentration der undissoziierten Form,  $\text{EC50}_u$ , die alleine den selben Effekt generiert wie die "Mischung". Bei Gültigkeit von Konzentrationsadditivität von dissoziierter und undissoziierter Form dürfen die Beiträge der "Mischungskomponenten" bzw. der Spezies zur beobachteten Gesamttoxizität nach Gl. 1 nicht größer als 100% sein. Wenn die Konzentration der einen und/oder der anderen Spezies in der Mischung ( $c(\text{fu})$  oder  $c(\text{fi})$ ) die Toxizität der Spezies ( $\text{EC50}_u$  bzw.  $\text{EC50}_i$ ) übersteigt, trägt die Spezies rechnerisch mit mehr als 100% ihrer Toxizität zur experimentell ermittelten Gesamttoxizität bei. Die Annahme von Konzentrationsadditivität ist nach Gl. 1 in diesen Fällen ungültig.

Für alle untersuchten Chlorphenole ist die Abweichung zwischen der Toxizität, die bei den verschiedenen pH-Werten beobachtet wurde, und der unter Annahme konzentrationsadditiven Zusammenwirkens der Spezies berechneten Toxizität im Mittel nicht größer als Faktor 1,1. Die Annahme einer Beteiligung der dissoziierten Spezies am Gesamteffekt ionogener Substanzen durch ein konzentrationsadditives Zusammenwirken mit der undissoziierten Spezies ist demzufolge grundsätzlich berechtigt. Im Einzelfall gilt dies unter Umständen aber nicht für alle Chlorphenole und nicht für das gesamte untersuchte pH-Fenster.

Die nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT berechnete Gesamttoxizität der Monochlorphenole ist in nahezu perfekter Übereinstimmung mit der bei den verschiedenen pH-Werten beobachteten Toxizität. Die Beobachtung unveränderter  $c(\text{fu})$  bei zunehmenden pH-Werten, die ein Indiz für die alleinige Wirksamkeit der undissoziierten Form darstellt (vgl. vorangehende Abschnitte desselben Kapitels 3.3.3), steht dabei nur scheinbar im Widerspruch zu einem aus den Ergebnissen *dieser* Analyse zu schließenden konzentrationsadditiven Zusammenwirken der Komponenten. Aufgrund der hohen pKs-Werte von 8,9 (3-Monochlorphenol) und 9,2 (4-Monochlorphenol) liegt für das untersuchte pH-Fenster (6,38 – 7,96) fast ausschließlich (mindestens zu 90%) die undissoziierte Form vor. Zusätzlich liegen

Tab. 25: Vergleich der für verschiedene pH-Werte nach Konzentrationsadditivität berechneten und der jeweils beobachteten Toxizität der untersuchten Chlorphenole. Neben den Anteilen der dissoziierten und undissoziierten Fraktion,  $f_u$  und  $f_i$  (berechnet nach Gl. 12 und 13), den Parametern der linearen Regression von  $1/EC50$  gegen  $f_i$ , und den Toxizitäten der protonierten und deprotonierten Spezies,  $EC50_u$  und  $EC50_i$  (berechnet nach Gl. 18), sind ebenso die bei Annahme konzentrationsadditiven Zusammenwirkens zu erwartenden  $EC50$  (Vorhersage  $EC50$ ) angegeben. Unter Verwendung des *Index on Prediction Quality* (IPQ) ist die Abweichung zwischen beobachteter und berechneter Toxizität als Faktor beschrieben. Zusätzlich sind die relativen Beiträge beider Spezies,  $f_i$  und  $f_u$ , zur experimentell ermittelten Toxizität dargestellt.

Substanz	pKa	pH	$f_u$	$f_i$	$1/EC50$ [µmol/L]	Regressionsparameter			Modellierte		Berechnete <sup>1</sup>	Beobachtete	Toxizitäts- Beitrag <sup>2</sup>			Abweichung von CA <sup>4</sup> um Faktor
						$1/EC50_u$ [µmol/L] (Achsenabschnitt)	$1/EC50_i-1/EC50_u$ (Steigung)	$r^2$	$EC50_u$	$EC50_i$	$EC50$ [µmol/L]	$EC50 \pm 95\% CI$ [µmol/L]	$f_u$	$f_i$	IPQ <sup>3</sup>	
3-Monochlorphenol	8,9	6,46	1,00	0,004	0,0087	0,0084	-0,0058	0,4228	119,13	382,38	119,43	114,95 ± 23,20	96,1	0,1	0,04	1,04
		7,00	0,99	0,01	0,0080						120,16	125,60 ± 5,32	104,1	0,4	-0,05	1,05
		7,93	0,90	0,10	0,0079						127,57	127,01 ± 40,36	96,4	3,2	0,004	1,00
4-Monochlorphenol	9,2	6,38	1,00	0,002	0,0026	0,0027	-0,0036	0,9585	377,11	-1033,03	377,88	380,90 ± 35,46	100,9	-0,1	-0,01	1,01
		7,00	0,99	0,01	0,0027						380,36	377,06 ± 22,34	99,4	-0,2	0,01	1,01
		7,96	0,95	0,05	0,0025						407,37	407,71 ± 11,40	102,2	-2,1	-0,001	1,00
2,4-Dichlorphenol	7,8	6,46	0,96	0,04	0,0364	0,0385	-0,0187	0,9114	25,94	50,35	26,50	27,50 ± 4,51	101,4	2,4	-0,04	1,04
		7,00	0,86	0,14	0,0377						27,79	26,55 ± 0,99	88,3	7,2	0,05	1,05
		7,87	0,46	0,54	0,0281						35,19	35,58	62,8	38,3	-0,01	1,01
3,5-Dichlorphenol	8,1	6,40	0,98	0,02	0,1962	0,2029	-0,0940	0,9442	4,93	9,18	4,97	5,10 ± 1,44	101,4	1,1	-0,02	1,02
		7,00	0,93	0,07	0,2015						5,10	4,96 ± 0,11	93,3	4,0	0,03	1,03
		7,99	0,56	0,44	0,1609						6,19	6,21 ± 0,35	70,7	29,7	-0,004	1,00
2,4,5-Trichlorphenol	6,9	6,38	0,77	0,23	1,7674	2,3707	-2,3830	0,9752	0,42	-81,30	0,55	0,57 ± 0,03	103,1	-0,2	-0,03	1,03
		6,51	0,71	0,29	1,6703						0,59	0,60 ± 0,06	100,8	-0,2	-0,01	1,01
		6,60	0,67	0,33	1,5983						0,63	0,63 ± 0,05	98,8	-0,3	0,01	1,01
		6,63	0,65	0,35	1,7219						0,65	0,58 ± 0,10	89,6	-0,2	0,12	1,12
		7,00	0,44	0,56	0,8411						0,96	1,19 ± 0,03	124,8	-0,8	-0,24	1,24
		7,44	0,22	0,78	0,5703						1,92	1,75 ± 0,27	93,1	-1,7	0,09	1,09
		7,55	0,18	0,82	0,3308						2,36	3,02 ± 0,32	131,1	-3,0	-0,28	1,28
		7,85	0,10	0,90	0,2748						4,34	3,64 ± 0,14	87,8	-4,0	0,19	1,19
		8,14	0,05	0,95	0,1736						8,52	5,76 ± 2,98	74,3	-6,7	0,48	1,48
2,4,6-Trichlorphenol	6,0	6,42	0,27	0,73	0,3136	1,0863	-1,0501	0,9573	0,92	27,59	3,09	3,19 ± 0,87	94,9	8,4	-0,03	1,03
		7,00	0,09	0,91	0,1655						7,59	6,04 ± 0,44	59,7	19,9	0,26	1,26
		7,99	0,01	0,99	0,0235						21,29	42,54 ± 9,97	47,2	152,6	-1,00	2,00
Pentachlorphenol	4,7	6,39	0,02	0,98	9,3898	444,1350	-443,7467	0,9985	0,0023	2,58	0,11	0,11 ± 0,005	95,5	4,1	0,00	1,00
		7,00	0,005	0,995	2,4059						0,38	0,42 ± 0,12	92,1	16,1	-0,08	1,08
		7,80	0,001	0,999	0,8951						1,35	1,12 ± 0,47	39,5	43,3	0,21	1,21

111

1 nach Gl. 17.  
 2 nach Gl. 19.  
 3  $IPQ = (EC50_{CA}/EC50_{beobachtet}) - 1$  für  $ECx$  vorhergesagt >  $ECx$  beobachtet; (Grimme et al., 1996a).  
 $IPQ = -(EC50_{beobachtet}/EC50_{CA}) - 1$  für  $ECx$  vorhergesagt <  $ECx$  beobachtet.  
 CA = KONZENTRATIONSADDITIVITÄT

die für beide Spezies berechneten Toxizitäten in gleichen Größenordnungen. Bei den untersuchten pH-Werten liegt  $f_i$  in so geringen Konzentrationen vor, daß der relative Beitrag der Wirkung der dissoziierten Form zur Gesamtwirkung der Substanz (0,1 bis 3,2% für 3-Monochlorphenol) - trotz eventuell tatsächlicher Konzentrationsadditivität beider Spezies – zu vernachlässigen ist. Bei Auftragen von  $c(f_u)$  gegen den pH-Wert (vgl. Abb. 25, A) ist der Beitrag der dissoziierten Spezies daher unter Umständen nicht in Form einer abfallenden Gerade sichtbar.

Die für die untersuchten Dichlorphenole hohe Korrelation ( $r^2 > 0,9$ ) zwischen  $1/EC_{50}$  und  $f_i$  ist ein Indiz für die Annahme konzentrationsadditiven Zusammenwirkens der Spezies dieser ionogenen Substanzen (Tab. 25). Auch die beobachteten  $EC_{50}$  stimmen für alle untersuchten pH-Werte fast perfekt mit den nach Konzentrationsadditivität berechneten  $EC_{50}$  überein. Diese Befunde sprechen gegen einen zusätzlichen Einfluß des pH-Wertes (vgl. Abb. 25, B; Tab. 22). Denn falls der pH-Wert als zusätzlicher abiotischer Stressor beeinträchtigend wirken sollte, wäre eine Abweichung der beobachteten Toxizität von der nach Konzentrationsadditivität berechneten Toxizität zu erwarten. Es ist daher berechtigt anzunehmen, daß die bei Auftragen von  $c(f_u)$  gegen den pH-Wert beobachtete Abnahme von  $c(f_u)$  mit zunehmenden pH-Werten ausschließlich auf das konzentrationsadditive Zusammenwirken von undissozierter und dissoziierter Form zurückzuführen ist.

Auch für 2,4,5-Trichlorphenol, 2,4,6-Trichlorphenol und Pentachlorphenol spricht die Übereinstimmung von beobachteter und berechneter Toxizität für weite Teile des untersuchten pH-Fensters für die Annahme eines konzentrationsadditiven Zusammenwirkens der Spezies. Für die höchsten pH-Werte (8,14, 7,99 und 7,80) besteht jedoch im Vergleich zu den jeweils übrigen pH-Werten eine höhere Abweichung zwischen beobachteter und nach Konzentrationsadditivität berechneter Toxizität (Faktor 1,48, 2,0 und 1,21 gegenüber einer für die übrigen pH-Werte mittleren Abweichung von Faktor 1,12; 1,14 und 1,04; Tab. 25). Die für 2,4,5-Trichlorphenol und Pentachlorphenol beobachtete Toxizität (5,76 und 1,12  $\mu\text{mol/L}$ ) ist höher als die nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT berechnete Toxizität (8,52 und 1,35  $\mu\text{mol/L}$ ), was als Hinweis auf einen Einfluß des pH-Wertes als abiotischen Stressor auf die Algenzellen zusätzlich zur Wirkung der Substanz gewertet werden könnte. Außer auf den pH-Wert könnte die erhöhte Toxizität aber auch auf einen im Vergleich zur undissoziierten Form und bei den übrigen pH-Werten höheren Beitrag der dissoziierten Form zur Gesamtwirkung zurückzuführen sein. Zwar ist für Pentachlorphenol die geschätzte Toxizität der dissoziierten Form (0,0023  $\mu\text{mol/L}$ ) um ca. 3 Größenordnungen kleiner als die geschätzte Toxizität der undissoziierten Form (2,58  $\mu\text{mol/L}$ ). Bei pH 7,8 übertrifft die dissoziierte jedoch die neutrale Form mengenmäßig um ebenfalls etwa 3

Größenordnungen (99,9% gegenüber 0,1%), so daß der Toxizitätsunterschied bei diesem pH egalisiert wird und der Beitrag der dissoziierten Spezies zur Gesamtwirkung der Substanz mit 43% den Beitrag der undissoziierten Form (39,5%) übersteigt. Sollte die Art des Zusammenwirkens der beiden Spezies zu einer gegenseitigen Wirkungsverstärkung führen, die vom Toxizitätsbeitrag der dissoziierten Form zur Gesamtoxizität abhängt, könnte dies die bei pH 7,8 vergleichsweise höhere Toxizität erklären. Ähnliche quantitative Betrachtungen sind für 2,4,5-Trichlorphenol wegen der negativen EC50i-Werte nicht möglich. Im Fall von 2,4,6-Trichlorphenol ist beim höchsten pH-Wert (7,99) die beobachtete Toxizität mit einem EC50 von 42,54 µmol/L niedriger als die nach Konzentrationsadditivität berechnete Toxizität (21,29 µmol/L). Aufgrund dieses Befundes ist der pH-Wert als die Toxizität von 2,4,6-Trichlorphenol erhöhender Faktor auszuschließen. Da der pKs der Substanz mit 6,0 unterhalb der untersuchten pH-Werte (6,42 – 7,99) liegt, ist 2,4,6-Trichlorphenol im untersuchten pH-Fenster größtenteils dissoziiert, mindestens zu 73%, bei pH 7,99 sogar zu 99%. Die bei pH 7,99 um mehr als 2 Größenordnungen mengenmäßige Überlegenheit der dissoziierten Form egalisiert die – auch um etwa 2 Größenordnungen – höhere Toxizität der undissoziierten Form, so daß die dissoziierte Spezies bei diesem pH-Wert mit 152% ihre Toxizität einen Beitrag zur Gesamtwirkung leistet, der – im Unterschied zu den übrigen pH-Werten - erheblich über den Beitrag der undissoziierten Form (47,2%) hinausgeht. Führt die Art des Zusammenwirkens beider Spezies in Abhängigkeit des Toxizitätsbeitrages der ionisierten Spezies zu einer Reduzierung der Gesamtwirkung, könnte dies möglicherweise die bei pH 7,99 im Vergleich zur Erwartung niedrigere Gesamtoxizität erklären.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse der Analyse der Kombinationswirkungen der "binären Gemische" aus dissoziierter und undissoziierter Spezies für eine Beteiligung der deprotonierten Spezies an der Gesamtwirkung der ionogenen Substanzen in Form eines konzentrationsadditiven Zusammenwirkens mit der protonierten Form. Für Substanzen, deren  $f_i$  zu  $f_u$ - sowie EC50i zu EC50u-Verhältnis bei bestimmten pH-Werten dazu führt, daß fast ausschließlich die undissoziierte Form zur Gesamtoxizität beiträgt, ist aber ebenso eine alleinige Wirkung der neutralen Komponente nicht auszuschließen. Abweichungen von der bei angenommener Konzentrationsadditivität berechneten Toxizität treten nur bei pH-Werten um 8 auf und für Substanzen, deren pKs-Werte zu einer bei diesem pH-Wert mengenmäßigen Dominanz der dissoziierten Form führen. Zusätzlich liegen deren EC50u und EC50i in Verhältnissen vor, die insgesamt zu einem Toxizitätsbeitrag der dissoziierten Form führen, der den Beitrag der undissoziierten Form zur Gesamtwirkung übersteigt. Trotzdem ist für diese Fälle nicht eindeutig zu klären, ob die Abweichungen zwischen beobachteter und nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT berechneter Toxizität auf Wirkungs-

verstärkende oder –reduzierende Interaktionen der Spezies oder auf einen Kombinationseffekt aus pH-Wert und den Spezies der ionogenen Substanzen zurückgeführt werden kann.

# 4 Diskussion



---

## 4 Diskussion

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Algentoxizität der Einzelstoffe, der multiplen Mischung und zur Abhängigkeit der Kombinationswirkung vom Milieufaktor pH sollen im folgenden anhand der Fragestellungen der Arbeit diskutiert werden. Im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchung stand die Frage nach der Vorhersagbarkeit der Toxizität einer Mischung, die einer realen-Welt-Situation (*“real-world-situation“*, Henschler et al., 1996) entspricht, d. h. einer Mischung aus Substanzen mit heterogenen Strukturen und größtenteils unklaren und unbekanntem Wirkungsmechanismen. Daher werden die zur Beantwortung dieser Frage relevanten Ergebnisse zu erst erörtert (Kapitel 4.1). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit der Einfluß und die Bedeutung verschiedener Größen auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung des multiplen Gemisches aus Umweltchemikalien untersucht. Da sich die für diese Fragestellungen wichtigen Ergebnisse im Laufe ihrer Diskussion von grundsätzlicher Bedeutung für die Vorhersagbarkeit und Beurteilung von Kombinationswirkungen erwiesen, werden sie in separaten Kapiteln erörtert. Nach der Besprechung des Einflusses des Milieufaktors pH auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung des multiplen Gemisches (Kapitel 4.2), sowie der Erörterung eventueller Ursachen der pH-Wert abhängigen Toxizität ionogener Substanzen (Kapitel 4.3), wird zuletzt die Relevanz niedriger Effektkonzentrationen für das Auftreten einer Kombinationswirkung betrachtet (Kapitel 4.4).

### 4.1 Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung von Umweltchemikalien

Wesentliche Voraussetzung für die Vorhersage und Beurteilung der Kombinationswirkung einer Mischung ist, daß die experimentellen Bedingungen, unter denen die Toxizität der Einzelstoffe und die Toxizität der Mischung ermittelt wurde, gleich sind. Denn wenn sich die experimentellen Bedingungen während der Einzelstoff- und Mischungstestung unterscheiden, ist nicht zu beurteilen, ob eine Abweichung oder Übereinstimmung der experimentell ermittelten von der auf der Basis der Einzelstofftoxizitäten prognostizierten Mischungstoxizität auf Interaktionen der Komponenten zurückzuführen ist, oder durch Unterschiede in den jeweiligen experimentellen Bedingungen erklärt werden muß. Daher werden zuerst Aspekte der Ergebnissicherheit besprochen (Kapitel 4.1.1), bevor Einflußgrößen für Abweichungen der beobachteten von der berechneten Mischungstoxizität erörtert werden (Kapitel 4.1.2). Nachfolgend wird die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der

Kombinationswirkung der untersuchten Mischung aus Umweltchemikalien unter besonderer Berücksichtigung der größtenteils unbekanntem Wirkungsmechanismen der Komponenten diskutiert (Kapitel 4.1.3) und anschließend ein Fazit gezogen (Kapitel 4.1.4).

### 4.1.1 Sicherheit der Ergebnisse

Die Ergebnissicherheit wird im folgenden erst für die Ergebnisse diskutiert, die in den Untersuchungen zur Charakterisierung der Toxizität der Einzelstoffe gewonnen wurden, und anschließend für jene Ergebnisse, die in den Untersuchungen zur Ermittlung der Toxizität der Mischung erhoben wurden.

#### EINZELSTOFFTESTUNG

Die *Genauigkeit* und die *Richtigkeit* der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelstoffe wurden durch verschiedene Schritte zur Qualitätskontrolle sichergestellt. Während die Genauigkeit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen entscheidend ist für die Beurteilung der Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität (vgl. Kapitel 2.3.1) ist die Richtigkeit der ermittelten Effektkonzentrationen sowohl bedeutend für die Abschätzung der Wirkungsspezifität (vgl. Kapitel 2.3.2 und 3.1.3) als auch für den Vergleich mit Literaturwerten. Beim Erstellen der wäßrigen Stammlösungen wurden die physikochemischen Eigenschaften der Substanzen berücksichtigt und die Handhabung der Substanzen optimiert, um die analytisch ermittelten *Konzentrationen* reproduzieren zu können. Die auf der Basis der analysierten Konzentrationen der wäßrigen Stammlösungen berechneten Testkonzentrationen wurden ebenfalls analytisch validiert und für 8 von 10 Substanzen normalisiert (vgl. Kapitel 2.3.2 und Tab. 10, Kapitel 3.1.2). Die angegebenen Testkonzentrationen können daher als valide betrachtet werden. Für Chloralhydrat wurde eine biologische Stabilitätskontrolle vorgenommen, so daß zumindest die Effekte für die jeweiligen Nominalkonzentrationen als stabil und reproduzierbar betrachtet werden können.

Ein Vergleich der auf der Basis gesicherter Konzentrationen aus den Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen berechneten *Effekte* mit entsprechenden Daten aus der Literatur ist in Tab. 26 dargestellt. Für Phoxim und Chloralhydrat waren in Faktendatenbanken wie z. B. AQUIRE keine Algentoxizitäten angegeben. Die ermittelten EC50 aller übrigen Substanzen sind in weitgehender Übereinstimmung mit den Literaturdaten, mit Ausnahme von Fluoranthren und den Organozinn-Verbindungen. Die für Fluoranthren ermittelte Toxizität ist

um ca. 2 Größenordnungen höher als in der Literatur angegeben. Eine mögliche Erklärung könnte die Veränderung der Toxizität infolge von Lichteinfluß sein, z. B. durch Bildung toxischer Metabolite. Denn zum einen ist eine photoinduzierte Erhöhung der Toxizität für PAHs in Grünalgen bekannt (Gala und Giesy, 1992), zum anderen wurden im verwendeten Algentest höhere Lichtintensitäten eingesetzt als z. B. im Algentest nach DIN/ISO 8692. Die dazu widersprüchlich erscheinende Übereinstimmung der Naphthalintoxizität mit Literaturdaten könnte auf mögliche substanzspezifische Unterschiede in ihren Absorptionsspektren zurückzuführen sein (Diamond et al., 2000). Die in der Literatur berichteten Algentoxizitäten der Organozinn-Verbindungen sind bis zu 2 Größenordnungen höher als die in der vorliegenden Studie ermittelten Toxizitäten. Dies könnte auf die für die Literaturwerte angegebenen längeren Expositionszeiten von mehreren Tagen im Vergleich zu 24h in unserem Algentest zurückzuführen sein. Bei Berücksichtigung der analytisch ermittelten Konzentration von Tributylzinnchlorid (vgl. Tab. 10, Kapitel 3.1.2), die nur 10% der Nominalkonzentration beträgt, wird der Unterschied der ermittelten Toxizität zu den Literaturwerten aufgehoben. Die aufgrund gerätetechnischer Probleme als unsicher zu betrachtende analytische Konzentration von Tributylzinnchlorid müßte allerdings noch in unabhängigen Analysen reproduziert werden. Die Abweichungen der ermittelten Effekte für Fluoranthen und die Organozinn-Verbindungen im Vergleich zu Literaturwerten können nicht abschließend erklärt werden. Dennoch konnten die für Fluoranthen, die Organozinn-Verbindungen wie auch für die übrigen Komponenten ermittelten Effekte in unabhängigen Versuchen unter Verwendung verschiedener wäßriger Stammlösungen mit analysierten Konzentrationen reproduziert werden.

Ferner zeigen die Konzentrations-Wirkungs-Daten der Einzelstoffe innerhalb eines Versuchsansatzes ein *konsistentes* Bild. Ein Indiz dafür ist die hohe Güte der Anpassung der biometrischen Modelle an die experimentellen Daten, die durch niedrige 95% Konfidenzintervalle der EC50 der Substanzen dokumentiert wird: die 95% Konfidenzintervalle aller Substanzen entsprechen beispielsweise einer durchschnittlichen Varianz von weniger als 7% der regressionsanalytisch geschätzten EC50. Die hohe Konsistenz der Konzentrations-Wirkungs-Daten ist hauptsächlich auf das verwendete Design zurückzuführen, was eine Anpassung des Verdünnungsfaktors an die Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen beinhaltet und so eine gleichmäßige Beschreibung des Effektbereiches von 1 - 80% ermöglicht.

Die *Stabilität* der Einzelstoffe über die Testdauer konnte mittels chemischer oder biologischer Analyse-Verfahren gezeigt werden (vgl. Tab. 10, Kapitel 3.1.2). Die Konzentrationsabnahme von Triphenylzinnchlorid (49%) könnte mit der Bildung von Metaboliten in Zusammenhang

stehen, was die Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität beeinträchtigt haben könnte. Dem entgegen steht die Beobachtung, daß die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Triphenylzinnchlorid in sich konsistent und reproduzierbar war.

Insgesamt gibt es keine Hinweise auf technische oder biologische Variabilitäten im Rahmen der Einzelstofftestung, die die Beurteilung der Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität entscheidend beeinträchtigt haben könnten. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen aller 11 untersuchten Substanzen können bezüglich ihrer Konsistenz, aber auch im Hinblick auf die eingesetzten Konzentrationen sowie die bei diesen erzielten Effekte als valide und reproduzierbar betrachtet werden. Trotzdem ist nicht auszuschließen, daß im Fall von Fluoranthen und den Organozinn-Verbindungen z. B. infolge von Photodegradation entstandene Metabolite die Art und die Intensität des Zusammenwirkens der Einzelstoffe in der Mischung beeinflusst haben.

Tab. 26: Einzelstofftoxizitäten der Mischungskomponenten im Vergleich zu Literaturdaten.

Name	CAS RN.	EC50 (beobachtet) mg/L	EC50 (Literatur) mg/L	Effekt und Expositionsdauer	Spezies	Quelle
Atrazin	1912-24-9	0,018	0,02-0,11	Wachstum, 4 Tage	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Grimme et al., 1994
Biphenyl *	92-52-4	0,232	5	Wachstum, 3 Tage	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Ramos et al., 1999
Chloralhydrat	302-17-0	283,33		Keine Angaben verfügbar		
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,222	0,39-3,1	Wachstum, 4 Tage	<i>Selenastrum capricornutum</i>	US-EPA, 1978
Fluoranthen	206-44-0	0,036	4,4-64,3	Wachstum, 4 Tage	<i>Selenastrum capricornutum</i>	US-EPA, 1978
Lindan	58-89-9	1,38	3,2	Wachstum, 3 Tage	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Schäfer et al., 1994
			1,3-3,9	Wachstum, 3-10 Tage	Diverse Grünalgen	Geyer et al., 1985
Naphthalin	91-20-3	3,79	3	physiol. Endpunkt, 0,17 Tage	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Millemann et al., 1984
			33	Wachstum, 1 Tag	<i>Chlorella vulgaris</i>	Kauss und Hutchinson, 1975
Parathion	56-38-2	5,27	0,008-25	Populationsparameter	Diverse Blau- und Grünalgen	Cole und Plapp, 1974; Mostafa et al., 1991
Phoxim	14816-18-3	0,210		Keine Angaben verfügbar		
Tributylzinnchlorid	1461-22-9	0,163	0,0034	Wachstum, 4 Tage	<i>Scenedesmus acutus</i>	Huang et al., 1993
			0,044	Wachstum, 4 Tage	<i>Chlorella vulgaris</i>	Huang et al., 1993
Triphenylzinnchlorid	639-58-7	0,113	0,0009	Wachstum, 12 Tage	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Fargasova, 1997
			0,0033	physiol. Endpunkt, 2 Tage	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Fargasova, 1997
			0,0056	Wachstum, 4 Tage	<i>Scenedesmus acutus</i>	Huang et al., 1993

\* Literaturdaten für 1,1-biphenyl-2-ol

##### MISCHUNGSTESTUNG

Die Konzentrationen der Komponenten in der Mischung sind Nominalkonzentrationen und aufgrund der analytischen Konzentrationen der wäßrigen Stammlösungen der Substanzen berechnet worden. Im Unterschied zur Einzelstofftestung sind die Konzentrationen der Substanzen, mit denen sie als Komponenten in der Mischung vorliegen, keine analytisch validierten Konzentrationen. Statt dessen wurden ausschließlich die eingesetzten wäßrigen Stammlösungen der Mischungskomponenten analytisch kontrolliert.

##### *Analytische Validierung der Mischungskonzentrationen*

Die chemische Analyse der Konzentrationen, mit denen die Komponenten in der Mischung vorliegen, ist zwar prinzipiell möglich, bedeutete jedoch zusätzlich zur Analyse der Einzelstoffkonzentrationen einen erheblichen Mehraufwand. Denn die für die Analyse der Einzelstoffkonzentrationen aufgebauten Methoden unterscheiden sich für die verschiedenen Substanzen teilweise erheblich (vgl. Tab. 4, Kapitel 2.3.2). Während für die Analyse der Konzentrationen einiger Substanzen Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (rp-HPLC) verwendet worden ist, sind die Konzentrationen anderer Stoffe gaschromatographisch analysiert worden. Auch bei Verwendung der gleichen Methode sind die methodischen Bedingungen für verschiedene Substanzen teilweise gravierend unterschiedlich. Für die Analyse der Mischung müßte daher de novo eine separate Methode aufgebaut werden, die diese unterschiedlichen methodischen Anforderungen der Substanzen berücksichtigt. Dabei käme erschwerend hinzu, daß die Komponenten in der Mischung in Konzentrationen vorliegen, die bloß einer Fraktion ihrer z. B. EC01 (EC01-Design) entsprechen. Selbst für die Einzelstoffe, deren jeweils höchste nominale Testkonzentration analytisch validiert wurde, war in manchen Fällen eine Anreicherung der Substanz notwendig, um die Konzentration überhaupt detektieren zu können. Für die Mischung wäre zu erwarten, daß ein Großteil der Komponenten in Konzentrationen vorliegt, die unterhalb ihres Detektionslimits liegen. Dies könnte zwar durch die Fraktionierung der Mischung mit anschließender Anreicherung der Fraktionen gelöst werden, würde aber einen erheblichen Arbeitsaufwand bedeuten.

##### *Übertragung der Ergebnisse der Einzelstoffanalytik*

Um die Sicherheit der Konzentrationen, in denen die Komponenten in der Mischung vorliegen, zu erhöhen, erscheint es naheliegend, die für die Einzelstoffe ermittelten analytischen Ergebnisse auf die Substanzen, wenn sie als Komponenten einen Teil der Mischung darstellen, zu übertragen. Dieses Vorgehen ist aber ebenfalls nicht ohne weiteres möglich. Die experimentelle Handhabung jeder Substanz als Einzelstoff wurde auf seine individuellen physikochemischen Eigenschaften abgestimmt (z.B. Volumen zu Headspace-Verhältnis). Als Komponente einer Mischung ist dies nicht mehr möglich. Außerdem ist es unklar, ob der Konzentrationsverlust, der für den Einzelstoff für *eine* bestimmte Testkonzentration ermittelt wurde, auf *andere* Testkonzentrationen, mit denen die Komponenten in der Mischung vorliegen, übertragbar ist. Hinzu kommt, daß die Konzentrationen der meisten Komponenten, mit der sie in der Mischung vorliegen, niedriger sind als die analysierten Nominalkonzentrationen der Einzelstoffe. Es ist durchaus denkbar, daß z. B. die Adsorption von Teilen einer lipophilen Substanz an den Algenzellen oder den Innenwänden der gläsernen Testgefäße für niedrigere Konzentrationen geringer ist als für höhere Konzentrationen. Denn ist die Adsorptionsfläche erst einmal gesättigt, ist eine zusätzliche Adsorption weniger wahrscheinlich, es sei denn durch Auflagerung auf die schon bestehende Schicht.

Für den theoretischen Fall, daß die für die Einzelstoffe ermittelten Konzentrationsverluste wider erwarten doch direkt auf die Konzentrationen der Komponenten, mit denen sie in der Mischung vorliegen, übertragbar sein sollten, entsprechen die Gesamtkonzentrationen der Mischung, bei denen diese einen Effekt von 50% erzielen, für das EC01-Design (428,8 – 672,8 µmol/L) und das EC50-Design (592,4 µmol/L) noch mehr als 99% der Nominalkonzentration. Nach erneuter Berechnung der zu erwartenden Mischungstoxizität nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG unter Berücksichtigung evtl. Konzentrationsverluste der Komponenten in der Mischung, die den in der Einzelstofftestung ermittelten Konzentrationsverlusten entsprechen, ändert sich der Wert des verwendeten Index zur Beurteilung der Abweichung zwischen beobachteter und berechneter Mischungstoxizität (IPQ) für die Mischung im EC01-Design geringfügig von 1,4 auf 1,5 (vgl. Tab. 17, Kapitel 3.2.2), während der IPQ-Wert für die Mischung im EC50-Design unverändert bleibt (1,1, vgl. Tab. 16, Kapitel 3.2.2). Dieser Vergleich verdeutlicht, daß selbst wenn die Komponenten in der Mischung in Konzentrationen vorliegen würden, die um die für die Substanzen als Einzelstoffe ermittelten Konzentrationsverluste reduziert sind, hätte dies keinen signifikanten Einfluß auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung der Mischung.

Ob die Komponenten in der Mischung tatsächlich in niedrigeren Konzentrationen als in der Einzelstofftestung vorlagen und ob dies die Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität entscheidend beeinflusst haben könnte, kann nicht abschließend beurteilt werden. Eine Möglichkeit, die Sicherheit der Konzentrationen der Mischungskomponenten zu verbessern, besteht in der systematischen Untersuchung der Ursachen der Konzentrationsverluste der Einzelstoffe in Abhängigkeit der Konzentration. Ein verbessertes Verständnis dieser Zusammenhänge könnte erlauben, die analytischen Ergebnisse der Einzelstoffe auf die Mischung zu übertragen. Ein möglicher Ansatz hierfür wäre der Vorschlag der OECD zur Klärung der Ursachen von Differenzen zwischen Nominal- und Realkonzentrationen für schwierig testbare Substanzen (2000). Eine endgültige Sicherheit über die Konzentrationen der Komponenten in der Mischung ist allerdings ausschließlich durch deren chemische Analyse zu erhalten. Für zukünftige Kombinations-Wirkungs-Analysen für Mischungen aus Umweltchemikalien erscheint der Mehraufwand, der mit dem Aufbau einer Analytik für die Konzentrationen der Komponenten in der Mischung verbunden ist, in Abhängigkeit der Fragestellung durchaus lohnend. Die Gewißheit darüber, daß die Konzentrationen der Substanzen als Komponenten in der Mischung genauso sicher sind wie die Konzentrationen der Substanzen als Einzelstoffe, könnte nicht nur dazu beitragen, eventuelle Abweichungen zwischen der beobachteten und der auf Basis der Einzelstofftoxizitäten berechneten Mischungstoxizität zu erklären. Zusätzlich würde die Sicherheit des experimentellen Ergebnisses erhöht und könnten eventuelle, chemische Interaktionen einiger Mischungskomponenten detektiert werden.

#### **4.1.2 Abweichungen von der Prognose nach Unabhängiger Wirkung**

Die beobachtete Toxizität der Mischung aus 11 Chemikalien mit heterogenen Strukturen und größtenteils unbekanntem Wirkungsmechanismus ist präziser unter Verwendung des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG als mit dem Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT vorhersagbar. Dies gilt mit Einschränkungen unabhängig vom Verhältnis, in dem die Komponenten in der Mischung vorliegen (vgl. Kapitel 3.2.2 und 3.3.2).

Werden die Komponenten im Verhältnis ihrer individuellen EC01- (**EC01-Design**) oder EC50-Werte (**EC50-Design**) gemischt und dieses Gemisch anschließend auf seine Wirksamkeit geprüft, ist eine Mischungstoxizität zu beobachten, die für niedrigere Konzentrationen bis 217 µmol/L (EC50-Design) und 394 µmol/L (EC01-Design) relativ gut mit der nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG berechneten Toxizität übereinstimmt (Abb. 14 und 15, Kapitel 3.2.2). Für die Mehrheit der Datensätze trifft diese Beurteilung auch für höhere

Gesamtkonzentrationen der Mischung zu, unabhängig vom Mischungsverhältnis der Komponenten. Für einige Datensätze ist jedoch bei höheren Gesamtkonzentrationen der Mischung eine Toxizität zu beobachten, die genauer mit der Prognose nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT als mit jener nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG übereinstimmt (EC50-Design: 28% der insgesamt 155 Datenpunkte, dargestellt als Dreiecke in Abb. 14, Kapitel 3.2.2; EC01-Design: insbesondere Datensätze C, D und F, Abb. 16, Kapitel 3.2.2). Obwohl diese Abweichung von der Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG in den Experimenten zur Untersuchung der Stabilität der Mischungstoxizität der Mischung im EC01- und EC50-Design nicht reproduziert werden konnte (vgl. Kapitel 3.2.3), bleibt deren Ursache ungeklärt. Werden die Komponenten der selben Mischung in Konzentrationen gemischt, die den NOECs der Komponenten als Einzelstoffe entsprechen und diese Mischung bei nur einer Konzentration, nämlich der Summe der NOECs der Einzelstoffe (675,6 µmol/L) auf ihre Wirksamkeit untersucht (**NOEC-Design**), ist das gleiche Ergebnis wie für höhere Konzentrationen der Mischung im EC01- und EC50-Design zu beobachten: die beobachtete Mischungstoxizität ist eher mit KONZENTRATIONSADDITIVITÄT als mit UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhersagbar (vgl. Abb. 17, Kapitel 3.2.2).

#### EINFLUß DES PH-WERTES UND DER PH-ABHÄNGIGEN TOXIZITÄT VON 2,4,5-TRICHLORPHENOL

Unter Berücksichtigung der tatsächlichen pH-Wert-Bedingungen während der Mischungstestung und der pH-abhängigen Toxizität von 2,4,5-Trichlorphenol (TCP) ist die Toxizität der Mischung im **NOEC-Design** in fast perfekter Übereinstimmung mit der Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG (vgl. Kapitel 3.3.2). Dieser Befund legt nahe zu überprüfen, ob die für höhere Konzentrationen der Mischung beobachtete höhere Toxizität im Vergleich zur Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG im EC01- und EC50-Design ebenfalls auf den Einfluß des pH-Wertes zurückzuführen sein könnte.

Für die Mischung im **EC01-Design** wurde die Vorhersagbarkeit der für alle Datensätze A - F (vgl. Abb. 16, Kapitel 3.2.2) ermittelten Mischungstoxizität unter Berücksichtigung der tatsächlichen pH-Wert-Bedingungen während der Mischungstestung reanalysiert. Das Vorgehen zur Rekalkulation der nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG zu erwartenden Mischungstoxizität entspricht dabei dem Verfahren, wie es für die Mischung im NOEC-Design durchgeführt und beschrieben worden ist (vgl. Kapitel 3.3.2). Im Unterschied zum NOEC-Design, wo die Mischung bei nur einer Gesamtkonzentration getestet wurde, ist die Mischung im EC01-Design bei verschiedenen Gesamtkonzentrationen auf ihre Wirksamkeit hin überprüft worden. Die pH-Werte, die für niedrigere Gesamtkonzentrationen gemessen

wurden, sind höher als die pH-Werte, die für höhere Konzentrationen der Mischung ermittelt wurden (Abb. 30). Das bedeutet, daß der Einfluß der pH-abhängigen Toxizität der ionogenen Substanz auf die Toxizität der Mischung für die verschiedenen Gesamtkonzentrationen der Mischung unterschiedlich groß ist (vgl. Kapitel 3.3.2). Um den Einfluß des pH-Wertes auf die Vorhersagbarkeit der Toxizität für *höhere* Gesamtkonzentrationen der Mischung im EC01-Design einschätzen zu können, wird es als ausreichend betrachtet, für die Rekalkulation der Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG ausschließlich *die* Toxizität von zu TCP berücksichtigen, die die Substanz beim jeweils *niedrigsten* pH-Wert generiert. Das Ergebnis ist in Abb. 30 dargestellt. Unter Berücksichtigung der tatsächlichen pH-Wert-Bedingungen und der pH-abhängigen Toxizität von TCP stimmen die beobachteten Mischungseffekte der überwiegenden Mehrheit der Datensätze der Mischung im EC01-Design (C, D und F, aber auch A und B), im Vergleich zur Vorhersage auf Basis der pH-Bedingungen des Standardtestprotokolls, für höhere Gesamtkonzentrationen genauer mit der rekalkulierten Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG überein. Da die pH-Werte für niedrigere Mischungskonzentrationen höher sind als für höhere Konzentrationen der Mischung, wird der Einfluß des pH-Wertes auf die Vorhersagbarkeit der beobachteten Mischungseffekte für niedrigere Mischungskonzentrationen überschätzt. Die pH-Werte für niedrigere Gesamtkonzentrationen betragen annähernd 6,9 und weichen daher nicht wesentlich von den pH-Wert-Bedingungen des Standardtestprotokolls ab. Daher ist anzunehmen, daß die Berücksichtigung der tatsächlichen pH-Werte bei der Berechnung der zu erwartenden Mischungseffekte für niedrigere Mischungskonzentrationen zu keiner wesentlichen Änderung im Vergleich zur Vorhersage auf Basis des Standardtestprotokolls führt.

Zusammenfassend ist die Abweichung zwischen den beobachteten und nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagten Effekten höherer Konzentrationen der Mischung im EC01-Design durchaus mit dem Einfluß des Milieufaktors pH und der pH-abhängigen Toxizität von TCP auf die beobachtete Mischungstoxizität und ihre Vorhersagbarkeit zu erklären. Werden die tatsächlichen pH-Wert-Bedingungen während der Mischungstestung bei der Berechnung der Effektprognose berücksichtigt, ist die beobachtete Mischungstoxizität für den *gesamten* Konzentrationsbereich der Mischung im EC01-Design mit dem Modell der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG vorhersagbar.

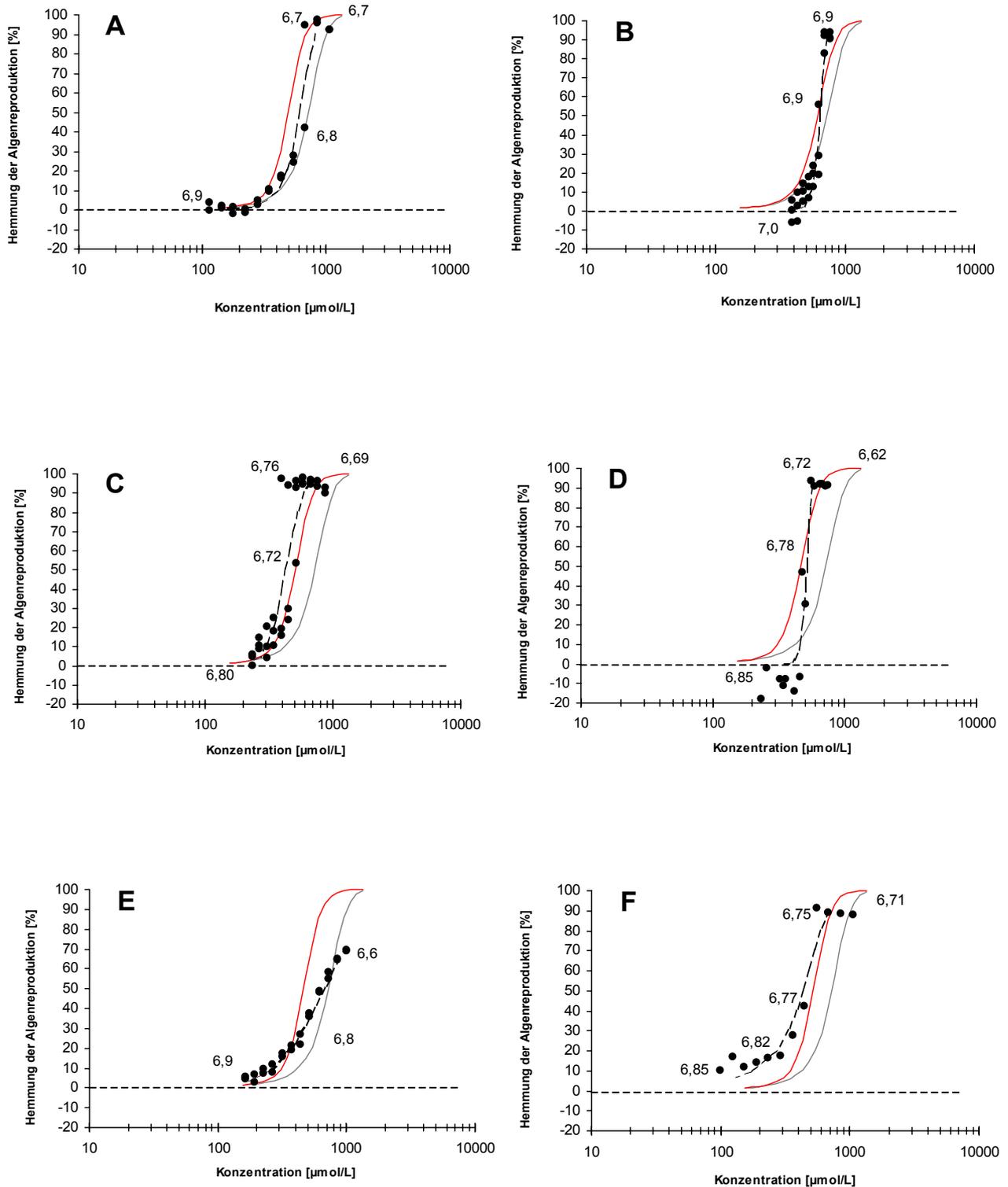


Abb. 30: Gegenüberstellung der beobachteten und nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG berechneten Toxizität der Mischung im EC01-Design. Für jeden Datensatz (A – F) sind die ermittelten Datenpunkte der Mischungstoxizität (schwarze Punkte), die modellierte Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der beobachteten Mischungstoxizität (---), die nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG (IA) auf der Basis des Standardtestprotokolls berechnete Mischungstoxizität (—) sowie die unter Berücksichtigung der tatsächlichen pH-Wert-Bedingungen und der pH-abhängigen Toxizität von 2,4,5-Trichlorphenol nach Unabhängiger Wirkung berechnete Toxizität der Mischung (—) dargestellt. Zusätzlich sind für einige Datenpunkte die gemessenen pH-Werte angegeben.

Um den für verschiedene Gesamtkonzentration der Mischung unterschiedlichen Einfluß des pH-Wertes bei der Rekalkulation der Prognose zu berücksichtigen, ist für Chemikaliengemische, die ionoge Substanzen enthalten, noch ein weiteres Vorgehen zur Berechnung der zu erwartenden Mischungstoxizität als oben beschrieben denkbar. Anstatt für die Rekalkulation der Prognose nur die Toxizität der ionogenen Substanz(en) bei dem *niedrigsten* pH-Wert, der für die verschiedenen Gesamtkonzentrationen der Mischung gemessen wurde, heranzuziehen, könnte die Toxizität der dissoziierbaren Komponente(n) in Abhängigkeit *aller* bei jeglichen Gesamtkonzentrationen gemessenen pH-Werte berücksichtigt werden. Für die Rekalkulation der Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG müßten dazu beispielsweise in einem 1. Schritt die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der ionogenen Substanzen, wie sie unter Standard-pH-Bedingungen ermittelt wurden, für *jegliche* in der Mischungstestung gemessenen pH-Werte korrigiert und modelliert werden. Mit Hilfe dieser pH-Wert spezifischen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen könnten in einem 2. Schritt die Effekte der ionogenen Substanzen regressionsanalytisch berechnet werden, die sie als Komponenten der Mischung

- in den Konzentrationen, mit denen sie in der Mischung vorliegen und
- bei den tatsächlich während der Mischungstestung und für eine bestimmte Gesamtkonzentration der Mischung vorherrschenden pH-Werten

erzeugen. In einem 3. und letzten Schritt könnten diese Effekte der Komponenten für die Berechnung der bei den verschiedenen Gesamtkonzentrationen der Mischung nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG zu erwartenden Toxizität der Mischung verwendet werden. Gleiches Verfahren kann auch entsprechend (regressionsanalytische Schätzung von *Effektkonzentrationen* in Schritt 2) für die Rekalkulation der Vorhersage nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT verwendet werden. Durch das geschilderte Vorgehen würde der unterschiedliche Einfluß der für verschiedene Gesamtkonzentrationen unterschiedlichen pH-Werte auf die Vorhersagbarkeit der Mischungseffekte berücksichtigt werden. Ob dieses Vorgehen zu einer verbesserten Vorhersagbarkeit führt, die den damit verbundenen Aufwand rechtfertigt, muß allerdings noch überprüft werden.

Der Einfluß des pH-Wertes und der pH-abhängigen Toxizität von 2,4,5-Trichlorphenol (TCP) auf die beobachtete Mischungstoxizität und deren Vorhersagbarkeit ist für die Mischung im **EC50-Design** auszuschließen. Im Unterschied zur Mischung im EC01-Design, wo TCP den steilsten Verlauf der Beziehung zwischen den Konzentrationen, in der die Substanz in der Mischung vorliegt, und den dabei generierten Effekten besitzt (80% bei der höchsten Konzentration der Mischung, vgl. Abb. 12, Kapitel 3.2.1), besitzt die Konzentrations-Effekt-

Beziehung von TCP der Mischung im EC50-Design den flachsten Verlauf aller Komponenten, und erzielt Effekte von maximal 3% (vgl. Abb. 11, Kapitel 3.2.1). Für die Mischung im EC50-Design ist daher auszuschließen, daß ein im Vergleich zum pH-Wert des Standardtestprotokolls um bis zu 0,3 Einheiten niedrigerer pH-Wert eine Erhöhung der Effektintensität der Komponente TCP in der Mischung nach sich zieht, wie es z. B. für die Mischung im EC01-Design beobachtet wurde.

Neben dem Einfluß des pH-Wertes auf die Mischungstoxizität und ihre Vorhersagbarkeit sind auch noch andere Erklärungen für die Abweichung der beobachteten von der nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG erwarteten Mischungstoxizität der Mischung im NOEC-Design sowie für höhere Konzentrationen der Mischung im EC01- und EC50-Design denkbar.

#### PIPETTIERFEHLER

Es ist nicht auszuschließen, daß die insbesondere für Umweltchemikalien teilweise geringen Löslichkeiten in Wasser oder Testmedium zusammen mit den Anforderungen des gewählten Designs zur Mischungstestung Einfluß auf die beobachtete Toxizität der Mischung und damit auf ihre Vorhersagbarkeit gehabt haben könnten. Denn die geringe Löslichkeit einer Substanz bedingt beispielsweise, daß das Pipettiervolumen, welches nötig ist um eine bestimmte molare Konzentration in der Mischungslösung zu erreichen, entsprechend hoch ist. Bei einem gegebenen Gesamtvolumen der Mischungslösung bedeutet dies für Substanzen mit hoher Löslichkeit, daß ihre Lösungen möglichst hoch zu konzentrieren sind, um kleine Pipettiervolumina zu erzielen. Für diese Substanzen können kleine, eventuell fehlerhafte Änderungen des Pipettiervolumens zu großen Änderungen der Konzentrationen führen, in denen die Komponente in der Mischung vorliegt, und nachfolgend zu Änderungen der Intensität des Effektes, den die Komponente als Teil der Mischung bei diesen Konzentrationen generiert. Die Änderungen dieser Effektintensität können insbesondere dann drastisch ausfallen, wenn die betreffende Substanz eine steile Beziehung zwischen der Konzentration der Komponente in der Mischung und den dabei erzeugten Effekten besitzt. Kleine Änderungen der Konzentration, in der die Komponente in der Mischung vorliegt, können dann große Änderungen der bei dieser Konzentration erzeugten Effektintensität nach sich ziehen. Sind die Effektintensitäten, die die betreffende Komponente in der Mischung erzeugt, zusätzlich dominant gegenüber denen der anderen Komponenten, ist ein entsprechend größerer Einfluß auf die Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität zu erwarten. Für die Mischung im EC01-Design besitzt die Komponente 2,4,5-Trichlorphenol (TCP) all die genannten Merkmale: eine hohe Wasserlöslichkeit (vgl. Tab. 9, Kapitel 3.1.1), die von allen

Komponenten steilste Beziehung zwischen den Konzentrationen der Komponente in der Mischung und den dabei erzeugten Effekten (vgl. Abb. 12, Kapitel 3.2.1). Außerdem erzielt TCP von allen Komponenten die höchsten Effekte bei Konzentrationen in der Mischung. Ähnliches gilt mit Einschränkungen für die Mischung im NOEC-Design. Es ist daher nicht auszuschließen, daß diese Eigenschaften in der Summe bei kleinen Pipettierfehlern der Substanz TCP zu großen Divergenzen zwischen beobachteter und berechneter Mischungstoxizität, wie es für die Mischung im NOEC-Design und für die Mischung im EC01-Design für höhere Gesamtkonzentrationen beobachtet worden ist, geführt haben könnten.

Pipettierfehler als Erklärung für die im Vergleich zur Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG höhere Toxizität von 28% der für Mischung im **EC50-Design** ermittelten Datenpunkte (vgl. Kapitel 3.2.2), sind allerdings eher unwahrscheinlich. Denn bei den Konzentrationen, mit denen die Komponenten in der Mischung im EC50-Design vorliegen, zeigt keine der Komponenten eine Steilheit der Beziehung zwischen Konzentration und Effekt (vgl. Abb. 11, Kapitel 3.2.1), die jener Steilheit von TCP im EC01-Design entspricht (vgl. Abb. 12, Kapitel 3.2.1). Weiterhin sind die Effekte, die bei Konzentrationen in der Mischung erzeugt werden, keiner der Komponenten ähnlich dominant wie die Effekte von TCP in der Mischung im EC01-Design. Es ist daher auszuschließen, daß kleine Pipettierfehler zu ähnlich großen Änderungen des Mischungseffekts geführt haben könnten, wie sie für die Mischung im NOEC- und EC01-Design in Betracht zu ziehen sind.

#### KONZENTRATIONSABHÄNGIGE WIRKUNGSQUALITÄT

Einen weiteren Ansatz zur Erklärung der für die Mischung in allen Mischungsverhältnissen ermittelten Divergenz zwischen der beobachteten und der nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG erwarteten Toxizität für höhere Mischungskonzentrationen bietet die aus der Pharmakologie stammende Vorstellung der konzentrationsabhängigen Wirkungsqualität. Der therapeutische Bereich eines Wirkstoffes, der auch mit dem Begriff der „therapeutischen Breite“ bezeichnet wird, beschreibt die Konzentrationsspanne, in der die gewünschte, therapeutische Wirkung erzielt wird, in Abgrenzung zu unerwünschten, toxischen (Neben-) Wirkungen bei höheren Konzentrationen (Pöch und Juan, 1985). Jeder Wirkstoff kann demnach in Abhängigkeit seiner Konzentration auf unterschiedliche Weise wirken. Daß dies auch für Substanzen in Algen gelten könnte, zeigt eine im Rahmen dieser Arbeit aufgenommene Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für 2,3,4,5-Tetrachlorphenol, die wegen ihrer Form aus weiteren Versuchen ausgeschlossen wurde (TetraCP, Abb. 31).

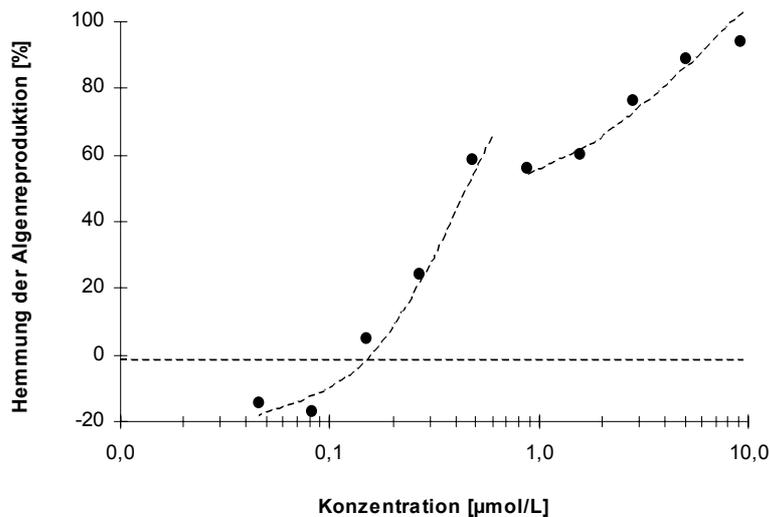


Abb. 31: Experimentell ermittelte Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für 2,3,4,5-Tetrachlorphenol. Die in ihrer Form außergewöhnliche Konzentrations-Wirkungs-Kurve könnte als aus zwei unterschiedlichen Kurven (schraffiert) bestehend, die für unterschiedliche Wirkungsweisen stehen, gedeutet werden.

Die in ihrer Form außergewöhnliche Konzentrations-Wirkungs-Kurve von TetraCP läßt sich interpretieren als die Überlagerung von zwei unterschiedlichen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für unterschiedliche Wirkungsweisen. Eine eindeutige Zuordnung der für Chlorphenole diskutierten Wirkungsmechanismen Entkopplung und Narkose (Schüürmann et al., 1996), zu einer der beiden Kurven erscheint problematisch. Folgte man der Annahme eines konzentrationsabhängigen Auftretens beider Wirkungsmechanismen, ist es plausibel, die spezifischere, entkoppelnde Wirkung dem Konzentrationsbereich zuzuordnen, für den die Konzentrations-Wirkungs-Kurve einen vergleichsweise steileren Verlauf aufweist (niedrigere Konzentrationen in Abb. 31), und die unspezifische Wirkungsweise dem Konzentrationsbereich mit einem flacheren Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve (höhere Konzentrationen in Abb. 31) zuzuweisen. Es ist prinzipiell nicht auszuschließen, daß einige Substanzen, im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen, in höheren Konzentrationen eine andere, unspezifische Wirkungsweise ausüben. Liegen mehrere solcher Substanzen in niedrigeren Konzentrationen vor, könnten ihre Wirkungsweisen unterschiedlich sein, bei höheren Konzentrationen hingegen könnten die Substanzen die unspezifische Wirkungsweise gemein haben. Liegen diese Substanzen als Komponenten einer Mischung vor, wäre zu erwarten, daß diese eine Toxizität generiert, die bei niedrigeren Mischungskonzentrationen aufgrund unähnlicher Wirkungsweisen der Komponenten eher nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhersagbar ist, und bei höheren Konzentrationen der Mischung aufgrund ähnlicher, unspezifischer Wirkungsweisen eher nach

KONZENTRATIONSADDITIVITÄT zu prognostizieren ist. Für die Komponenten des 11-Stoffgemisches gibt die hohe Konsistenz der Konzentrations-Wirkungs-Daten der Einzelstoffe (vgl. Kapitel 4.1.1) allerdings keine Anhaltspunkte für die Annahme unterschiedlicher Wirkungsmechanismen in Abhängigkeit der Konzentrationen. Das Auftreten einer unspezifischen Wirkungsweise als gemeinsamer Wirkungsmechanismus bei höheren Konzentrationen der Komponenten ist daher unwahrscheinlich. Insgesamt ist nicht davon auszugehen, daß Änderungen der Wirkungsweisen der Komponenten des untersuchten 11-Komponenten Gemisches in Abhängigkeit der Konzentrationen, mit denen sie in der Mischung vorliegen, zu einer im Vergleich zur Vorhersage nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG erhöhten Mischungstoxizität bei höheren Mischungskonzentrationen geführt haben.

#### 4.1.3 Unkenntnis der Wirkungsmechanismen

Die prinzipielle Tauglichkeit der Konzepte zur Vorhersage und Beurteilung von Kombinationswirkungen von Chemikaliengemischen, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT UND UNABHÄNGIGE WIRKUNG, ist inzwischen eindrücklich belegt worden (Faust et al., 2000; Backhaus et al., 2000; Altenburger et al., 2000). Die Wirkungsmechanismen der in diesen Untersuchungen verwendeten Chemikalien waren allerdings bekannt und zusätzlich spezifisch ähnlich bzw. spezifisch unähnlich. Faust et al. (2000) testeten eine Mischung aus 18 in Grünalgen strikt ähnlich wirkenden s-Triazinen (Inhibitoren des photosynthetischen Elektronentransportes) in einem 24h Algentest mit *Scenedesmus vacuolatus* und fanden eine Mischungstoxizität, die perfekt mit dem Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT prognostiziert werden konnte. Das gleiche Ergebnis erzielten Altenburger et al. (2000) für eine nach identischen Kriterien zusammengestellten Mischung aus 16 Phenolderivaten mit Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung als gemeinsamen, molekularen Wirkungsmechanismus in einem 30min. Biolumineszenz-Inhibitions-Assay mit *Vibrio fischerii*. Aber ebenfalls für strikt unähnlich wirkende Substanzen konnten Faust et al. (2000) Referenzfälle von Kombinationswirkungen zeigen. Die Algentoxizität (24h, Inhibition der Reproduktion) einer Mischung aus 16 Substanzen, von denen 15 unterschiedliche, spezifische Wirkorte in der einzelligen Grünalge *Scenedesmus vacuolatus* aufwiesen, die 12 verschiedene Stoffwechselprozesse beeinflussten, und einem kationischen Tensid unspezifisch membranschädigender Wirkung, war in hervorragender Übereinstimmung mit der Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG. Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mischung aus Umweltchemikalien mit größtenteils unklaren oder unbekanntem

Wirkungsmechanismen ist die Wahl des Referenzkonzeptes zur Beurteilung der Vorhersagbarkeit der beobachteten Kombinationswirkung vergleichsweise schwieriger.

Die beobachtete Mischungstoxizität des 11-Komponenten Gemisches ist genauer nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhersagbar als nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT (vgl. Kapitel 3.2.2). Dies gilt mit Einschränkungen für die Mischung unabhängig von den Verhältnissen, in denen die Komponenten in der Mischung vorliegen. Diese Befunde sprechen dafür, daß die Wirkungsmechanismen der Mischungskomponenten in einer Weise unähnlich sind, die ausreicht, um die Toxizität der Mischung mit dem Modell der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG vorherzusagen. Da die Wirkungsmechanismen für die Mehrheit der Mischungskomponenten jedoch unbekannt sind, ist nicht auszuschließen, daß die Wirkungsmechanismen der Komponenten tatsächlich ähnlich sind und die Komponenten auf eine konzentrationsadditive Weise zusammenwirken. In diesem Fall müßte die beobachtete Kombinationswirkung unter Bezug auf die Prognose nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT beurteilt werden. Unter Verwendung von KONZENTRATIONSADDITIVITÄT als Referenzkonzept würde die beobachtete Kombinationswirkung als Antagonismus interpretiert werden (vgl. Kapitel 1.3). Eine Erklärung für die niedrigere Toxizität der Mischung im Vergleich zur Erwartung nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT wäre, daß eine oder mehrere Komponenten die Mischungstoxizität verändert haben könnten. Falls dies der Fall gewesen sein sollte, wäre zu erwarten, daß die Toxizität der Mischung ohne diese Komponente(n) genauer mit KONZENTRATIONSADDITIVITÄT als mit UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorherzusagen ist. Diese Hypothese wurde geprüft, in dem die Mischung im EC01- und EC50-Design in 10 zusätzlichen Experimenten erneut auf ihre Wirksamkeit getestet wurde, diesmal unter Weglassen von einer oder zwei Komponente(n), von der (denen) angenommen werden konnte, daß sie die Toxizität der Mischung verändern vermag (vermögen) (vgl. Kapitel 3.2.3). Die Toxizität dieser um ein oder zwei Komponenten verkleinerten Mischungen stimmten jedoch alle mit der Prognose nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG überein und bestätigten auf diese Weise die richtige Verwendung von UNABHÄNGIGER WIRKUNG als Referenzkonzept zur Beurteilung der Vorhersagbarkeit der Toxizität des 11-Komponenten Gemisches. Obwohl die Mischung insgesamt ohne 10 der 11 Komponenten erneut getestet wurde, ist allerdings nicht auszuschließen, daß die Mischung nicht ohne *die* Kombination von Komponenten getestet wurde, die für die Erniedrigung der Toxizität im Vergleich zur Prognose nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT verantwortlich zeichnet.

Die Sicherheit, daß die Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität des 11-Komponenten Gemisches tatsächlich stabil ist, könnte erhöht werden, in dem weitere Mischungsexperimente unter Weglassen von zwei oder mehr Komponenten durchgeführt

werden. Eine andere Möglichkeit wäre zu überprüfen, ob die Kombinationswirkung einiger Komponenten eher mit KONZENTRATIONSADDITIVITÄT als mit UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorherzusagen ist. Dies wäre sinnvoll, da für den Großteil der Mischungskomponenten eine unspezifische Wirkungsweise anzunehmen ist, die zwischen polarer und unpolarer Narkose liegt (vgl. Kapitel 3.1.3). Es ist daher nicht auszuschließen, daß einige Komponenten eine unspezifische Wirkungsweise als ähnliche Wirkungsweise gemein haben könnten. Einen theoretischen Ansatz zur Prüfung dieser Hypothese bieten Vorstellungen von Hermens und Leeuwangh (1982) zu einer Änderung der Qualität der Kombinationswirkung in Abhängigkeit der Konzentrationen, in denen die Komponenten in der Mischung vorliegen. Hermens und Leeuwangh (1982) untersuchten 5 Mischungen aus jeweils 8 Komponenten und einer Mischung aus 24 Komponenten, für die sie diverse Wirkungsmechanismen annahmen, an Guppies (*Poecilia reticulata*, 14d). Als Erklärung für die relativ gute Vorhersagbarkeit der Mischungstoxizität nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT vermuteten sie, daß äquitoxische Mischungen aus organischen Komponenten mit mehr oder weniger lipophilen Eigenschaften und unterschiedlichen, spezifischen Wirkungsmechanismen konzentrationsadditiv wirken. Voraussetzung des konzentrationsadditiven Zusammenwirkens der Komponenten sei, daß deren Konzentrationen in der Mischung so gering sind, daß ihre spezifischen Wirkungen nicht in Erscheinung treten und die geringen Konzentrationen sich mit ihren verbleibenden unspezifischen Wirkungen (z.B. Narkose) addieren. Der Beitrag der Minimumtoxizität der Komponenten zur Toxizität der Mischung wurde numerisch durch einen Wert ausgedrückt, der als M(QSAR) bezeichnet wurde. Zur Berechnung des M(QSAR)-Wertes wurden die Konzentrationen, mit denen die Komponenten am beobachteten LC50 der Mischung in der Mischung vorlagen, als fraktionaler Teil der für die Komponenten als Einzelstoffe berechneten Minimumtoxizität ausgedrückt. Die Summe dieser Toxic Units (Sprague, 1970; Marking, 1977) ergibt den M(QSAR)-Wert für die Mischung. Der M(QSAR)-Wert lag für alle Mischungen zwischen 0,02 und 0,31, was einem 2 bis 31prozentigen Beitrag der Minimumtoxizität zur beobachteten Gesamtttoxizität der untersuchten Mischungen entspricht. Hermens und Leeuwangh schloßen daraus, daß die Komponenten mit ihrer ausschließlich auf ihrer Lipophilie basierenden Toxizität nur teilweise zur Kombinationswirkung der Mischung beigetragen haben.

Der Beitrag der Minimumtoxizität der Komponenten zur beobachteten Toxizität der in dieser Arbeit untersuchten Mischung wurde exemplarisch für einen Datensatz der Mischung im EC01-Design (Datensatz D, vgl. Abb. 16, Kapitel 3.2.2) und für die Mehrheit der Daten der Mischung im EC50-Design (111 Datenpunkte, vgl. Abb. 14, Kapitel 3.2.2) in Form des M(QSAR) berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt.

Die M(QSAR)-Werte für die Mischung im EC01-Design (0,11) und im EC50-Design (0,19) zeigen, daß die Summe der Konzentrationen, mit denen die Komponenten an der geschätzten EC50 der Mischung vorliegen, um ca. das 5- bis 10-fache höher sein müßte, um die beobachtete Toxizität ausschließlich mit der Minimumtoxizität der Komponenten erklären zu können. Der Beitrag der Minimumtoxizität der Komponenten zur Toxizität des 11-Komponenten Gemisches liegt damit in der gleichen Größenordnung wie von Hermens und Leeuwangh (1982) für die von ihnen untersuchten Mischungen berechnet worden ist. Es kann demnach weitgehend ausgeschlossen werden, daß die beobachtete Mischungstoxizität hauptsächlich auf einer unspezifischen, unpolaren Wirkungsweise der Komponenten beruht. Dieses Ergebnis steht nicht nur in Einklang mit den Untersuchungen zur Spezifität der Wirkungsmechanismen der Substanzen (vgl. Kapitel 3.1.3), in denen für alle Substanzen spezifischere Wirkungsmechanismen als unpolare Narkose ermittelt wurden. Darüber hinaus ist dieses Ergebnis ein weiteres Indiz dafür, daß die Wirkungsmechanismen der Mischungskomponenten tatsächlich auf eine Weise unähnlich sind, die rechtfertigt, das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG als Referenzkonzept zur Beurteilung der für die 11-Komponenten Mischung beobachteten Kombinationswirkung zu verwenden.

Tab. 27: Beitrag der Minimumtoxizität der Komponenten zur beobachteten Toxizität der Mischung im EC01- und EC50-Design (nach Hermens und Leeuwangh, 1982).

Komponente	EC01-Design <sup>1</sup>	EC50-Design <sup>2</sup>	LogKow <sup>3</sup>	EC50 <sub>Minimumtox</sub> <sup>4</sup>	TU <sup>5</sup>	
	[µmol/L]	[µmol/L]		[µmol/L]	EC01-Design	EC50-Design
Atrazin	0,014	0,028	2,6	1056,8	0,000014	0,000026
Biphenyl	0,341	0,508	4,0	77,6	0,0044	0,0065
Chloralhydrat	498,716	577,549	1,0	20893,0	0,024	0,028
2,4,5-Trichlorphenol	0,685	0,379	3,7	135,8	0,0050	0,0028
Fluoranthren	0,025	0,034	5,2	8,3	0,0030	0,0041
Lindan	0,790	1,601	4,1	64,4	0,012	0,025
Naphthalin	4,928	9,970	3,3	286,4	0,017	0,035
Parathion	4,323	6,103	3,8	112,7	0,038	0,054
Phoxim	0,004	0,237	4,4	36,8	0,00010	0,0064
Tributylzinnchlorid	0,027	0,092	5,8	2,7	0,010	0,034
Triphenylzinnchlorid	0,045	0,098	2,8	727,8	0,000062	0,00014
				<b>(M)QSAR <sup>6</sup>:</b>	0,114	0,196

1 Konzentrationen, mit denen die Komponenten der Mischung im EC01-Design am regressionanalytisch ermittelten EC50 (Datensatz D) vorliegen; ; EC50 = 509,9 µmol/L (vgl. Abb. 16, Tab. 17, Kapitel 3.2.2).

2 vgl. Anmerkung 1 bezogen auf die 111 Datenpunkte der Mischung im EC50-Design; EC50 = 596,6 µmol/L (vgl. Abb. 14, Tab. 16, Kapitel 3.2.2).

3 UBA, 1999

4  $\log EC50_{\text{Minimumtoxizität}} (\text{mol/L}) = -0,81 * \log Kow - 0,87$  (Gl. 5, Kapitel 2.2; vgl. Kapitel 3.1.3)

5 TU (Toxic Unit) = Konzentration [µmol/L] der Komponente in der Mischung (Spalte 2) / EC50<sub>Minimumtoxizität</sub> (Spalte 5) (nach Hermens und Leeuwangh, 1982)

6 (M)QSAR =  $\sum TU$  (nach Hermens und Leeuwangh, 1982)

### 4.1.4 Fazit

Die Ergebnisse der Kombinations-Wirkungs-Analyse der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mischung zusammen mit deren Diskussion führen insgesamt zu dem Schluß, daß die Mischungstoxizität der untersuchten Mischung aus Umweltchemikalien mit dem Modell der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG vorhersagbar ist. Darüber hinaus ist die Annahme berechtigt, daß die Wirkungsmechanismen der Mischungskomponenten in einer Weise unähnlich sind, die die Verwendung des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG als Referenzkonzept zur Beurteilung der beobachteten Kombinationswirkung rechtfertigt. Mit diesen Ergebnissen wird zum ersten Mal demonstriert, daß das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG für die Beurteilung der Kombinationswirkung einer Mischung aus strukturell heterogenen Chemikalien mit unklaren und unbekanntem Wirkungsmechanismen von Bedeutung ist.

Damit stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Widerspruch zu Ergebnissen von Hermens et al. (1984b) und Hermens und Leeuwangh (1982), die berichteten, daß die Toxizität von Mischungen aus Chemikalien mit unterschiedlichen Strukturen und mit als unähnlich antizipierten Wirkungsmechanismen unter Verwendung des Konzeptes der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT vorhersagbar ist. In beiden Studien wurde die beobachtete Mischungstoxizität unter Verwendung des Mischungstoxizität Indices (Mixture toxicity Index, *MTI*, vgl. Kapitel 1.5) beurteilt: eine nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG zu erwartende Mischungstoxizität wurde nicht explizit berechnet. In einer der Untersuchungen wurde ebenfalls nicht gezeigt, daß die Toxizität der Mischungskomponenten höher war als ihre Minimumtoxizität, die allein auf die Lipophilie der Substanzen zurückzuführen ist (Hermens und Leeuwangh, 1982). Eine unpolare unspezifische Wirkungsweise als allen Mischungskomponenten gemeinsamer Wirkungsmechanismus kann daher für die in jener Studie untersuchten Mischungen als Erklärung für die Vorhersagbarkeit nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT nicht ausgeschlossen werden. Doch auch wenn in einer anderen Untersuchung gezeigt wurde, daß die Mischungskomponenten spezifischere Wirkungsmechanismen als unpolare Narkose besitzen (Hermens und Leeuwangh 1982), wurde die Kombinationswirkung der Mischung als konzentrationsadditiv beurteilt und steht damit in Opposition zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Obwohl die Substanzen, aus denen die in dieser Arbeit untersuchte Mischung zusammengesetzt wurde, aus einer chemometrischen Sichtweise unähnliche Strukturen aufweisen (vgl. Kapitel 2.2), kann aus den Ergebnissen dieser Studie nicht geschlossen werden, daß die strukturelle Unähnlichkeit der Substanzen direkt mit einer Unähnlichkeit

ihrer Wirkungsmechanismen in Zusammenhang steht. Denn die Grenze, die ähnliche von unähnlichen Strukturen trennt, ist abhängig von den angelegten Kriterien und dem verwendeten Maß für Unähnlichkeit. Solange strukturelle Unähnlichkeit mit dem Maß geringerer struktureller Ähnlichkeit bezogen auf eine bestimmte Auswahl von zu beurteilenden Chemikalien gemessen wird (Gramatica und Consolaro, 1999; Consolaro et al., 2000; Gramatica et al., 2001), bleibt die chemometrische Bewertung "strukturell unähnlich" eine relative Einteilung, gültig ausschließlich für die untersuchte Gruppe von Chemikalien. Eine Verankerung des chemometrischen Klassifizierungsergebnisses auf einer geeichten Maßskala ist bis dato nicht möglich. Ein Vergleich von "Graden" struktureller Unähnlichkeit von verschiedenen Mischungen ist aber nötig, wenn man beurteilen will, welcher Grad an struktureller Unähnlichkeit für die mit dem Verfahren der Kombinations-Wirkungs-Analyse untersuchten Mischung vorlag und in anderen Mischungen mit unbekanntem Wirkungsmechanismen der Komponenten mindestens vorliegen muß, um die Wahl des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG für die Prognose und Beurteilung der Kombinationswirkung zu rechtfertigen. Ferner ist noch unklar, welche chemischen Deskriptoren welche chemischen und biologischen Interaktionen beschreiben. Solange dieser Zusammenhang nicht verstanden ist, ist es nicht möglich, Chemikalien mit unbekanntem Wirkungsmechanismus aufgrund ihrer Struktur in Gruppen ähnlich und unähnlich wirkender Substanzen einzuteilen (Vighi et al., submitted).

Ob das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG zur Vorhersage und Beurteilung der Toxizität für die Mehrzahl von Mischungen aus strukturell heterogenen Chemikalien mit unbekanntem Wirkungsmechanismen, wie sie wahrscheinlich in der Umwelt zu finden sind, relevant ist oder ob das in dieser Studie ermittelte Ergebnis ein Einzelfall ist, bleibt offen und muß durch die Untersuchung von anderen Mischungen aus Umweltchemikalien bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Studie widerlegen eindeutig die Annahme, daß das Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT generell als Referenzkonzept zur Vorhersage und Beurteilung der Kombinationswirkung von Mischungen verwendet werden kann, wie in der Literatur behauptet wird (Berenbaum, 1985; van Leeuwen, 1991), auch für Mischungen aus solchen Chemikalien, deren Wirkungsmechanismen unklar oder unbekannt sind. Für die Vorhersage und Beurteilung der Kombinationswirkung von Mischungen aus Umweltchemikalien sollte das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG zukünftig in Betracht gezogen werden.



## 4.2 Einfluß des Milieufaktors pH auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung von Kombinationswirkungen

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Relevanz des Milieufaktors pH für die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung des untersuchten multiplen Gemisches zeigen deutlich, daß eine Berücksichtigung der pH-abhängigen Toxizität der ionogenen Mischungskomponente 2,4,5-Trichlorphenol bei der Berechnung der zu erwartenden Kombinationswirkung zu einer verbesserten Validität ihrer Vorhersagbarkeit und ihrer Beurteilung führt (vgl. Kapitel 3.3.2).

Das Ausmaß der Beeinträchtigung der Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung einer multiplen Mischung durch den pH-Wert und die davon abhängige Toxizität einer Mischungskomponente ist unter anderem abhängig vom Verhältnis zwischen dem pH-Fenster des verwendeten Testsystems und dem pKs-Wert der Substanz. Denn die bei einer bestimmten Änderung des pH-Wertes resultierende Höhe der Toxizitätsänderung einer ionogenen Substanz ist grundsätzlich an ihre Dissoziation gekoppelt, die nach Henderson-Hasselbalch über das Verhältnis zwischen pKs der Substanz und dem pH des Mediums bestimmt wird (vgl. Kapitel 3.3.1 und 3.3.3). Für extreme pKs-pH-Wert-Verhältnisse beispielsweise liegt die ionogene Substanz bei jeglichem pH-Wert des pH-Fensters des verwendeten Testsystems entweder vollständig dissoziiert oder vollständig undissoziiert vor, so daß in diesen Fällen keine Änderung der Toxizität in Abhängigkeit des pH-Wertes zu erwarten ist, und somit auch kein Einfluß auf die Mischungstoxizität und ihre Vorhersagbarkeit und Beurteilung. Das Verhältnis, in dem die Komponenten einer Mischung zusammengesetzt sind, zusammen mit dem toxischen Potential der ionogenen Substanz sowie der Steilheit ihrer Konzentrations-Wirkungs-Kurve sind weitere Faktoren, die das Ausmaß des Einflusses auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung eines Chemikaliengemisches bestimmen. Bei Änderung des externen pH-Wertes ist zum Beispiel eine vergleichsweise größere Beeinträchtigung zu erwarten, wenn die ionogene Substanz – bestimmt durch das Mischungsverhältnis der Komponenten und der Gesamtkonzentration der Mischung – in hohen Konzentrationen in der Mischung vorliegt bei gleichzeitig hohem toxischen Potential und einem relativ steilen Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve: geringe Änderungen des pH-Wertes resultieren in solchen Fällen in vergleichsweise deutlichen Änderungen des Beitrages der ionogenen Substanz zum Gesamteffekt der Mischung.

Die Relevanz der Frage nach dem Einfluß des Milieufaktors pH auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung von Kombinationswirkungen von Chemikaliengemischen wird durch einen Vergleich verschiedener ISO-Normen und OECD-Richtlinien deutlich, die dem pH-Wert in Standardtests zur Bestimmung der Toxizität von Chemikalien erheblich unterschiedliche Bedeutung beimessen (Tab. 28).

Tab. 28: Vergleich der Relevanz des pH-Wertes in verschiedenen ISO-Normen und OECD-Richtlinien zur Bestimmung der Toxizität von Chemikalien.

Norm / Richtlinie	Organismus und Testprotokoll	pH-Wert Relevanz
ISO 6341 (1996)	Daphnia magna, 24/48h; Mortalität	stabil innerhalb 0,2 Einheiten
OECD 215 (2000)	Fische, 28d, Wachstum	stabil innerhalb 0,5 Einheiten
OECD 201 (1984)	Algen, 72h, Wachstum	näherungsweise 8
ISO 8692 (1991)	Algen, 72h, Wachstum	Abweichung < 1,5 Einheiten
OECD 202 (1984)	Daphnia sp., 24h, Immobilisation und Reproduktion	keine pH-Wert-Einstellung
OECD 203 (1992)	Fische, 96h, Mortalität	keine pH-Wert-Einstellung
OECD 204 (1984)	Fische, 14d, Mortalität	keine pH-Wert-Einstellung
OECD 210 (1992)	Fische, 60d, Physiol. Endpunkte	keine quantitativen Angaben
OECD 211 (1998)	Daphnia magna, 21d, Reproduktion	keine quantitativen Angaben

Während einige Normen und Richtlinien anmahnen, den pH-Wert innerhalb mehr oder weniger enger Bereiche stabil zu halten, wie z. B. innerhalb  $\pm 0,2$  Einheiten (ISO 6341), fordern andere nur an einen Richtwert angenäherte pH-Werte (OECD 201), tolerieren eine Abweichung um 1,5 Einheiten (ISO 8692), was de facto einen Varianzbereich von insgesamt 3 pH-Einheiten bedeutet, empfehlen grundsätzlich keine Einstellung des pH-Wertes (OECD 203) oder machen überhaupt keine quantitativen Angaben (OECD 210).

Aber nicht nur unter Laborbedingungen ist der Einfluß des pH-Wertes und der davon abhängigen Toxizität ionogener Substanzen bedeutend für die Vorhersagbarkeit und Beurteilung von Kombinationswirkungen von Chemikaliengemischen. Abhängig von u. a. dem Kalkgehalt und der damit verbundenen Pufferkapazität, kann der pH-Wert in Seen und anderen Oberflächenwässern auf natürliche Weise zwischen pH 4,5 und pH 11 variieren (Lampert und Sommer, 1993). Außerdem wird für Umweltproben im Rahmen einer Gefährdungsbeurteilung entweder eine Gesamtoxizität bestimmt, oder die stoffliche Zusammensetzung einer solchen Chemikalienmischung ermittelt (Brack et al., 1999). Die Beobachtung einer pH-abhängigen Toxizität eines solchen Gemisches (McLeay et al, 1979) bleibt so in den meisten Fällen ohne Bezug zu den dafür verantwortlichen Substanzen, was

eine Beurteilung des Einflusses des pH-Wertes und der pH-abhängigen Toxizität auf die Beurteilung der Kombinationswirkung eines solchen Gemisches unmöglich macht. Ansätze wie TIE (Toxicity Identification and Evaluation), die chemische Methoden zur Identifikation der Komponenten solcher Stoffgemische mit biologischen Methoden zur Toxizitätsbestimmung verbinden, mit dem Ziel, die für die Toxizität verantwortlichen Substanzen zu identifizieren (Brack et al., 1999), könnten die für die Toxizität einer solchen "Umweltmischung" relevanten ionogenen Substanzen detektieren und so in einem ersten Schritt zu einer Beurteilung ihres Einflusses auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung der Mischung beitragen.



### 4.3 Zu den Ursachen pH-Wert-abhängiger Toxizität

Es ist eine allgemein akzeptierte Vorstellung, daß die Toxizität ionogener Chemikalien wie z. B. phenolischer Substanzen von ihrem Dissoziationsgrad, sprich dem Verhältnis ihres pKs-Wertes und des pH-Wertes des sie umgebenden Milieus, abhängig ist (Crandall und Goodnight, 1959; Sills and Allen, 1971; Marking, 1975; Dalela et al, 1980; Holcombe et al., 1980; Könemann und Musch, 1981; Saarikoski und Viluksela, 1981; Kishino und Kobayashi, 1995; Schüürmann, 1998, Escher et. al.; 1999). Art und Ausmaß des Beitrages der für phenolische Substanzen vorliegenden Phenol- und Phenolat-Spezies zur Gesamtoxizität ist aber noch umstritten.

Eine von vielen Autoren geteilte Vorstellung besteht darin, daß die Zunahme der Toxizität mit abnehmenden pH-Wert im Wesentlichen auf die Zunahme der undissoziierten Form zurückzuführen ist (Holcombe et al., 1980; Könemann und Musch, 1981; Kishino und Kobayashi, 1995). Teil dieser Vorstellung ist die Annahme, daß hauptsächlich (Könemann und Musch, 1981) oder ausschließlich (Kishino und Kobayashi, 1995) die undissoziierte Form in die Membran eindringen und sie durchqueren kann. In Untersuchungen zur Toxizität von 12 Chlorphenolen auf Goldfische bei pH-Werten von 6 und 8 beobachteten Kishino und Kobayashi (1995), daß die Toxizität für jedes Chlorphenol fast unverändert bleibt, wenn der pH-Wert des Mediums kleiner ist als der pKs-Wert der Substanz (also dann, wenn der Anteil der undissoziierten Form an der Gesamtkonzentration aus undissoziierter und dissoziierter Spezies > 50% beträgt), jedoch mit zunehmenden pH-Wert plötzlich abnimmt, wenn der pH-Wert größer ist als der pKs-Wert der Substanz (der Anteil der undissoziierten Spezies an der Gesamtkonzentration < 50%). Aus diesen Beobachtungen und einer guten Korrelation zwischen der Anreicherung über die äußere Körperoberfläche des untersuchten Organismus (in Form des experimentell ermittelten Biokonzentrationsverhältnisses) und der Lipophilie der Substanzen ( $\log K_{ow}$ ) schlossen sie, daß die pH-Wert-abhängige Toxizität hauptsächlich auf die passive Diffusion der undissoziierten Form in die Membran zurückzuführen sei. Fahl et al. (1995) untersuchten die Aufnahme und die Toxizität von herbiziden Sulfonylharnstoffen in bzw. auf *Chlorella vacuolata* bei pH-Werten zwischen 5 und 7. Eine Korrelation zwischen den bei verschiedenen pH-Werten ermittelten Biokonzentrationsfaktoren und der Toxizität der Substanzen waren Indiz dafür, daß die Herbizide die Algenzellmembran aufgrund ihrer Lipophilie hauptsächlich in ihrer undissoziierten Form durchqueren. Weiter wurde vermutet, daß die Substanzen innerhalb der Zellen durch "ion-trapping" akkumulieren, da zum einen die Konzentrationen der undissoziierten Fraktion bei verschiedenen externen pH-Werten und für gleiche Effektniveaus ähnlich waren und zum anderen, weil der interne pH-Wert bei den

untersuchten variierenden externen pH-Werten weitgehend unverändert ist (Küsel, et. al., 1990).

Die in der vorliegenden Arbeit bei verschiedenen pH-Werten beobachtete Gesamtoxizität kann unter bestimmten Bedingungen für die Mehrheit der Substanzen ebenfalls auf die alleinige Wirksamkeit der undissoziierten Form zurückgeführt werden. Die Annahme der alleinigen Wirksamkeit der neutralen Form scheint gerechtfertigt, wenn die mengenmäßige Dominanz der undissoziierten Form bei gleichzeitig ähnlichem toxischen Potential im Vergleich zur ionisierten Form dazu führt, daß der toxische Beitrag der undissoziierten Spezies mit der Gesamtoxizität der Substanz nahezu übereinstimmt (vgl. Tab. 25, Kapitel 3.3.3). Dies gilt für die untersuchten Monochlorphenole aufgrund ihrer vergleichsweise hohen pKs-Werte (8,9 und 9,2) und ähnlichen Toxizitäten der Spezies (EC50u und EC50i) für das gesamte untersuchte pH-Fenster (6,38 – 7,96) und ebenso für 2,4,5-Trichlorphenol und Pentachlorphenol, mit Ausnahme der jeweils höchsten pH-Werte um 8. Für die übrigen Substanzen vermag der berechnete toxische Beitrag der undissoziierten Form die beobachtete Gesamtoxizität insbesondere für die niedrigsten pH-Werte (z.B. 3,5-Dichlorphenol für pH 6,4) zu erklären. Für einige Substanzen sprechen zusätzlich die bei gleichem Effektniveau und für verschiedene pH-Werte annähernd konstanten Konzentration der undissoziierten Form,  $c(fu)$ , für eine alleinige Wirksamkeit der neutralen Spezies. Im Fall der Monochlorphenole gilt dies für das gesamte pH-Fenster (vgl. Abb. 25, A), für 2,4,5-Trichlorphenol und Pentachlorphenol könnten die  $c(fu)$  für weite Teile des untersuchten pH-Bereiches als konstant interpretiert werden (Abb. 25, C und D und Tab. 22, Kapitel 3.3.3).

Einer anderen Vorstellung zufolge ist die pH-Wert-abhängige Toxizität ionogener Substanzen nicht ausschließlich auf die Aktivität der undissoziierten Phenol-Form allein zurückzuführen, sondern zusätzlich auf den Beitrag der ionisierten Spezies (Schüürmann, 1998; Saarikoski und Viluksela, 1981; Terada, 1990; Finkelstein, 1970; Escher et al., 1999). Saarikoski und Viluksela (1981) beobachteten, daß die Abnahme der Toxizität von brom-, chlor-, und nitro-substituierten Phenolen auf Guppies mit Zunahme des pH-Wertes nicht so groß war wie aufgrund der Abnahme der Konzentration der undissoziierten Form im umgebenden Wasser zu erwarten gewesen wäre. Sie schlossen, daß nicht nur die undissoziierte Spezies, sondern auch die ionisierte Form zur Gesamtoxizität beiträgt. Aufbauend auf Tabatas Arbeiten (zitiert nach Könemann und Musch, 1981), der erstmals 1962 ein mathematisches Modell zur Berechnung der pH-Wert-abhängigen Toxizität veröffentlichte, haben Könemann und Musch (1981) die Toxizität von 11 Chlorphenolen auf Guppies bei 3 verschiedenen pH-Werten (6,1, 7,3, und 7,8) beschrieben. Mit Hilfe des Modells von Tabata konnten die experimentell nicht ermittelbaren Toxizitäten beider Spezies bei

vollständiger Protonation ( $T_m$ ) und Ionisation ( $T_i$ ) auf vergleichsweise einfache Weise berechnet werden.  $T_m$  wurde dabei als maximale Toxizität der Substanz kalkuliert. Für die theoretisch maximale Toxizität  $T_m$  aller Chlorphenole und für die Toxizitäten der 3 pH-Werte wurden QSAR-Gleichungen mit  $\log K_{ow}$  und  $pK_s$  als Deskriptoren erstellt. Der  $pK_s$ -Term der pH-QSARs wich für größere pH-Werte, sprich mit Zunahme der Menge an dissoziierter Spezies, zunehmend vom  $pK_s$ -Term der  $T_m$ -Qsar ab. Daraus schlossen die Autoren, daß der  $pK_s$ , sprich die Dissoziation der Substanzen, Einfluß auf die pH-abhängige Toxizität der untersuchten Chlorphenole hat. Obwohl unter anderem die Aufnahme und Bioakkumulation der undissoziierten Form als eine Erklärung der pH-Wert-abhängigen Toxizität diskutiert wurde, gestehen die Autoren ein, daß es ihnen nicht möglich ist anzugeben, welche Spezies die aktive und welche Bedeutung der Dissoziation tatsächlich zukommt. Schüürmann (1998) geht einen Schritt weiter und nutzte Könemanns experimentelle Daten und Formeln zur Berechnung der experimentell nicht zu ermittelnden Toxizitäten der neutralen und der ionisierten Spezies (entsprechend Gl.18 und Abb. 29, Kapitel 3.3.3), um deren Beiträge zur Gesamtoxizität bei angenommenem konzentrationsadditivem Zusammenwirken der Spezies zu berechnen. Die Ergebnisse seiner Berechnungen für pH 7 zeigen deutlich, daß die dissoziierten Fraktionen substantiell zur Toxizität von Phenolen beitragen, insbesondere für Substanzen mit  $pK_s$ -Werten kleiner oder gleich dem pH-Wert. Darüberhinaus zeigen die Ergebnisse, daß die Gesamtoxizitäten fast aller untersuchten Chlorphenole unter Annahme konzentrationsadditiven Zusammenwirkens der beiden Spezies beschrieben werden können.

Die Ergebnisse der Analyse der Kombinationswirkung aus dissoziierter und undissoziierter Form der vorliegenden Arbeit können teilweise im Sinne der Ergebnisse von Schüürmann (1998) interpretiert werden. Eine mittlere Divergenz von experimentell ermittelter und berechneter Toxizität um Faktor 1,1 stützt die Annahme, daß die dissoziierte und die undissoziierte Spezies der untersuchten Chlorphenole im beobachteten pH-Fenster grundsätzlich auf konzentrationsadditive Weise zusammenwirken. Für die Dichlorphenole sowie 2,4,6-Trichlorphenol sprechen zusätzlich die mit zunehmenden pH-Werten abfallenden Konzentrationen der neutralen Spezies für ein konzentrationsadditives Zusammenwirken beider Spezies (vgl. Abb 25, B). Auffällig sind die Abweichungen der bei Konzentrationsadditivität der Spezies zu erwartenden Toxizität zu der beobachteten Toxizität von 2,4,5-Trichlorphenol ( $pK_s$  6,9) 2,4,6-Trichlorphenol (6,0) und Pentachlorphenol (4,7) bei den jeweils höchsten pH-Werten von 8,14, 7,99 und 7,80. Dabei sind zwei Fälle zu unterscheiden: für 2,4,5-Trichlorphenol und Pentachlorphenol ist die beobachtete Toxizität deutlich höher als erwartet, für 2,4,6-Trichlorphenol deutlich niedriger. Als mögliche Erklärungen für eine erhöhte bzw. erniedrigte Toxizität sind Interaktionen der Spezies, die zu einer Verstärkung bzw. Reduzierung der Gesamtwirkung führen, diskutiert worden (vgl.

Kapitel 3.3.3). Für Pentachlorphenol und 2,4,6-Trichlorphenol fallen insbesondere die hohen Beiträge der dissoziierten Form zur Gesamttoxizität bei pH 7,8 und 7,99 auf, die die Beiträge der neutralen Spezies übersteigen, was für die übrigen Chlorphenole bei den unterschiedlichen pH-Werten nicht beobachtet wurde. Insofern könnte eine Wirkungsverstärkung bzw. -reduzierung an Bedingungen gekoppelt sein, die zu einem höherem Toxizitätsbeitrag der dissoziierten Form im Vergleich zur undissoziierten Form führen: wie der Dissoziationsgrad der Substanz in Abhängigkeit des pH-pKs-Wert-Verhältnisses im Zusammenspiel mit dem Verhältnis der toxischen Potentiale der beiden Spezies (vgl. Kapitel 3.3.3). Ein weiterer Erklärungsansatz für die höhere Gesamttoxizität des Gemisches aus ionisierter und neutraler Spezies im Vergleich zur nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT berechneten Toxizität könnte die Annahme eines zusätzlichen Beitrages zur Gesamttoxizität durch eine weitere Spezies sein: eines Heterodimers, gebildet aus der dissoziierten und der undissoziierten Form. Mechanistische Vorstellungen von der entkoppelnden Wirkung phenolischer Substanzen gehen von einem "Shuttle-Mechanismus" aus, in dem unter Beteiligung eines geladenen Heterodimers aus Phenol- und Phenolatform Hydroxid-Ionen über die Membran transportiert werden (Finkelstein, 1970). Basierend auf diesen Vorstellungen entwickelten Escher et al. (1999) ein toxikokinetisches Modell zur Erklärung der entkoppelnden Wirkung von 7 Nitrobenzolen- und Chlorphenolen in Abhängigkeit vom pH-Wert (5,2 – 9,0) und der Gesamtkonzentration in Membran-Vesikeln (Chromatophore), die aus dem Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides* gewonnen wurden. Die experimentell ermittelten Toxizitäten konnten durch das Modell sehr gut beschrieben werden. Eine Übertragung der Ergebnisse von Escher et al. auf das in dieser Arbeit verwendete Algentestsystem ist allerdings nicht ohne weiteres möglich. Escher et al. arbeiteten mit einem weitaus spezifischeren Endpunkt und außerdem an isolierten Membranvesikeln im Vergleich zur in der vorliegenden Arbeit untersuchten Reproduktionshemmung nach einer Algengeneration. Nicht nur die Zellwand von *Scenedesmus vacuolatus*, bestehend aus einer äußeren trilaminaren Struktur und einer inneren mikrofibrillären Schicht (Weich, 1983) könnte toxikokinetische Prozesse im Vergleich zum Chromatophor unterschiedlich beeinflussen. Im Gegensatz zu dem 2-Phasen-System von Escher et al. (1999) stellen Algenzellen ein Mehrphasensystem mit unterschiedlichen Kompartimenten (u. a. Vakuole, Chloroplast, Mitochondrium, Cytoplasma, Zellwand) dar. Zusätzlich zu den kinetischen Prozessen an und in der Zellwand und der Außenmembran des Mitochondriums bzw. des Chloroplasten wäre noch der Einfluß der Diffusionsstrecken und der Einfluß der in den drei Kompartimenten (Periplasmatischer Raum, Cytosol und Perimitochondrialer Raum) unterschiedlichen pH-Wert-Bedingungen zu untersuchen.

Zur Erklärung der höheren Toxizität von 2,4,5-Trichlorphenol und Pentachlorphenol im Vergleich zur nach Konzentrationsadditivität berechneten Toxizität bei pH-Werten um 8 ist neben Interaktionen der an der Gesamtwirkung beteiligten Spezies aber auch ein Kombinationseffekt unter zusätzlicher Beteiligung des pH-Wertes des Testmilieus nicht auszuschließen. Wie in Kapitel 3.3.3 diskutiert, ist anzunehmen, daß der Grenz-pH-Wert, ab welchem solch ein Kombinationseffekt aus dem Einfluß des externen pH-Wertes und der toxischen Wirkung der Substanz in Form einer erhöhten Toxizität sichtbar wird, abhängig ist von den Wirkungsmechanismen der Substanzen und dem Mechanismus der "Wirkung" des pH-Wertes. Die für Chlorphenole angenommenen Wirkungsmechanismen sind durchaus nicht uniform und reichen von Narkose über polare Narkose bis zu einer spezifischen Wirkung in Form der Entkopplung von Elektronentransportprozessen an Energieübertragenden Membranen. Auch für die Regulation der pH-Wert-Homöostase werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Drei Gruppen werden unterschieden (Roos und Boron, 1981): Pufferung durch im Cytoplasma vorhandene Säure-Base-Systeme, Konsumption von Protonen oder Hydroxylionen durch spezielle Stoffwechselprozesse, und aktiver Transport von Protonen oder Hydroxylionen über Membranen aus dem Cytoplasma in Vakuolen oder den extrazellulären Raum. Ähnliche Mechanismen der toxischen Wirkung der Substanzen einerseits und der pH-Wert-Homöostase andererseits könnten dazu führen, daß die Fähigkeit der Zellen zur Gegenregulation bei variierenden, externen pH-Werten durch die Wirkung der Substanzen beeinträchtigt wird. Die Intensität des schädlichen Einflusses des externen pH-Wertes und der Grenz-pH-Wert wären dann unmittelbar an die Wirkungsweise und -intensität der Substanzen geknüpft, also substanzspezifisch. Diese Vorstellung würde erklären, weshalb für einige Chlorphenole um pH 8 ein Kombinationseffekt mit dem pH-Wert zu beobachten ist und für andere nicht.

Welche Bedingungen letztendlich tatsächlich für die beobachteten Abweichungen zwischen beobachteter und nach Konzentrationsadditivität berechneter Toxizität verantwortlich zeichnen, ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend zu beurteilen.

Die Analyse der pH-abhängigen Toxizität ionogener Chlorphenole ergibt insgesamt ein heterogenes Bild. Die Ergebnisse der pH-Wert-abhängigen Toxizität können weder für alle Substanzen einheitlich noch für alle Substanzen eindeutig entweder im Sinne einer alleinigen Wirksamkeit der undissoziierten Form oder im Sinne einer Beteiligung der Wirkung der dissoziierten Form an der Gesamtwirkung bzw. im Sinne eines konzentrationsadditiven Zusammenwirkens der Spezies interpretiert werden. Gleichwohl überwiegen für einige Substanzen die Hinweise für die undissoziierte Form als einzig effektive Komponente

(Monochlorphenole, 2,4,5-Trichlorphenol und Pentachlorphenol für weite Bereiche des pH-Fensters), während für andere Substanzen die Indizien für die konkurrierende Annahme der Beteiligung der dissoziierten Form an der Gesamtwirkung überwiegen (Dichlorphenole, 2,4,6-Trichlorphenol, sowie für 2,4,5-Trichlorphenol und Pentachlorphenol bei pH-Werten um 8). In den Fällen, wo ionogene Einzelsubstanzen als "binäre Gemische" aus Phenol- und Phenolatform betrachtet werden können, ist diese Erkenntnis nicht nur bedeutend für die Interpretation von Kombinationswirkungen von Gemischen aus ausschließlich ionogenen Substanzen, für die z. B. synergistische Effekte aufgrund der Formation von Heterodimeren aus der neutralen Spezies einer Mischungskomponente und der ionisierten Spezies einer anderen Substanz vermutet werden (Escher et al., 1999). Auch für Mischungen aus ionogenen und nicht-ionogenen Chemikalien ist die Betrachtung von ionogenen Einzelsubstanzen als 2-Komponenten-Gemische bedeutend; insbesondere dann, wenn die Art und die Intensität der Kombinationswirkung der dissoziierten und der undissoziierten Form unter gewissen Bedingungen für bestimmte pH-Werte tatsächlich unterschiedlich ist (z. B. für 2,4,6-Trichlorphenol bei pH 7 "konzentrationsadditiv" und bei pH 8 "weniger toxisch als nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT"). Denn die Unterschiede zwischen den pH-Werten und der Toleranz der pH-Wert-Variation sind für verschiedene Testsysteme zur Bestimmung der Toxizität von Chemikalien beträchtlich (vgl. Kapitel 4.2). Der standardisierte 72h Wachstumshemmtest für Algen z. B. empfiehlt einen pH-Wert von 8,3 bei einer Toleranz der pH-Wert Varianz von bis zu 1,5 Einheiten (ISO 8692, 1989). Für 2,4,6-Trichlorphenol beispielsweise ist bei pH 7 im Unterschied zu pH 8 nicht nur eine in ihrer *Intensität* andere Wirkung zu erwarten, dessen Einfluß auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung des Gemisches am Beispiel von 2,4,5-Trichlorphenol demonstriert wurde (vgl. Kapitel 3.3.2). Zusätzlich könnte sich bei pH 8 die *Qualität* des Zusammenwirkens der Spezies von 2,4,6-Trichlorphenol im Vergleich zu pH 7 unterscheiden, was die Kombinationswirkung der gesamten Mischung nicht nur hinsichtlich ihrer *Intensität* sondern auch bezüglich ihrer *Qualität* verändern könnte. Die tatsächliche Relevanz der Art des Zusammenwirkens der dissoziierten und undissoziierten Form für die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkungen von Gemischen aus ionogenen und nicht-ionogenen Substanzen müßte aber erst noch gezeigt werden. Dazu gehört auch ein noch besseres Verständnis der Hintergründe der pH-Wert-abhängigen Kombinationswirkung aus dissoziierter und undissoziierter Form sowie des vermeintlichen Einflusses des pH-Wertes als abiotischer Stressor.

#### 4.4 Niedrige Effektkonzentrationen

Eine häufig geteilte Annahme besteht darin, daß das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG zur Vorhersage der Toxizität von Mischungen aus unähnlich wirkenden Komponenten taugt, wenn diese in der Mischung in hohen Konzentrationen vorliegen (Broderius et al., 1995, Henschler et al., 1996, Pape-Lyndstrom und Lydy, 1997). Wenn die Komponenten einer Mischung aus unähnlich wirkenden Substanzen allerdings in Konzentrationen vorliegen, die kleiner oder gleich ihrer individuellen 'no observed effect concentrations' (NOECs. vgl. Kapitel 1.6) sind, ist auch für die Mischung kein Effekt mehr zu erwarten, es sei denn die Mischungskomponenten interagieren auf eine synergistische Weise (Cassee et al., 1998, Henschler et al., 1996; vgl. Kapitel 1.6 und Gl. 4, Kapitel 1.2). Implizit ist diese Ansicht auch in Entscheidungen zur Beurteilung des Risikos von Chemikalien enthalten, wenn diese auf Informationen von einzelnen Stoffen beruhen, wie z. B. im Rahmen der Chemikalienregulation (EIFAC, 1987). Experimentelle Evidenzen für diese Annahme sind rar. Zusammenfassend berichten Cassee et al. (1998) über eine Reihe von 4-wöchigen Toxizitätsuntersuchungen an Ratten zur Untersuchung der Kombinationswirkung von Mischungen aus 4 bis 9 Komponenten, die jeweils bei ihren individuellen 'no observed adverse effect level' (NOAEL) oder 'lowest observed adverse effect level' (LOAEL) vorlagen und wozu verschiedene Toxizitätsparameter verwendet wurden. Für Mischungen aus Chemikalien mit unterschiedlichen Zielorganen und / oder unterschiedlichen Wirkungsmechanismen schlossen sie aufgrund der Ergebnisse ihrer Untersuchungen, "daß die Exposition an eine Kombination aus Chemikalien keine offensichtlich erhöhte Gefahr darstellt, vorausgesetzt die Dosis jeder individuellen Chemikalie entspricht einem NOAEL". In anderen Studien wurde die Toxizität von Gemischen aus teratogenen und Antitumor-Substanzen in niedrigen Konzentrationen untersucht, aber keine Kombinationswirkung detektiert, die größer gewesen wäre, als die Wirkung, die eine Komponente in gleichen Konzentrationen als Einzelsubstanz erzielt (Streffer et al., 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen dazu in deutlichem Widerspruch. Für die Mischung, in der die Komponenten in Konzentrationen vorliegen, die ihren individuellen NOECs entsprechen (NOEC-Design), ist ein Effekt ermittelt worden, der deutlich höher ist, als die Effekte, die die Mischungskomponenten einzeln bei den Konzentrationen erzeugen, mit denen sie in der Mischung vorliegen (vgl. Kapitel 3.2.1). Zusätzlich ist die beobachtete Mischungstoxizität unter Berücksichtigung der tatsächlichen pH-Wert Bedingungen des Milieus und der pH-abhängigen Toxizität der Komponente 2,4,5-Trichlorphenol in fast perfekter Übereinstimmung mit der Vorhersage nach dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG (vgl. Kapitel 3.3.2). In den Konzentrationen, die den individuellen NOECs der

Einzelstoffe entsprechen, erzeugen die Substanzen noch Effekte zwischen ca. 4% und 13% (vgl. Abb. 13, Kapitel 3.2.1). In anderen Untersuchungen werden die Effekte, die Substanzen bei ihren NOECs generieren, mit 10 bis 30% angegeben (Moore und Caux, 1997). Vor diesem Hintergrund ist es wenig plausibel anzunehmen, daß NOECs Konzentrationen darstellen, bei der keine biologische Antwort ausgelöst wird. Vielmehr ist davon auszugehen, daß eine NOEC eben keine no effect concentration (NEC) ist, sondern daß eine NOEC vielmehr die obere Grenze eines Konzentrationsbereiches markiert, für den Effekte zwar nicht mit statistischer Signifikanz quantifiziert, aber auch nicht ausgeschlossen werden können (vgl. Kapitel 1.6).

Um zu prüfen, ob für eine Mischung aus Umweltchemikalien auch dann noch eine Toxizität zu beobachten ist, wenn Komponenten der Mischung in Konzentrationen vorliegen, die niedriger sind als ihre individuellen NOECs, ist die Mischung zusätzlich auf ihre Wirksamkeit getestet wurden, wenn die Komponenten in Konzentrationen vorliegen, die dem Verhältnis ihrer individuellen EC01-Werte entsprechen (EC01-Design). Die in Form einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ermittelte Toxizität der Mischung im EC01-Design ist in Abb. 12 (Kapitel 3.2.1) dargestellt. Bei einer Gesamtkonzentration der Mischung im EC01-Design von 428,5 µmol/L liegen die Komponenten der Mischung in Konzentrationen vor, die im Mittel um Faktor 2,6 niedriger sind als ihre jeweiligen NOEC und bei denen die Komponenten einzeln einen Effekt von 1% generieren. Diese Mischungskonzentration ist im Inlet der Abb. 32 markiert. Der Effekt, den die Mischung im EC01-Design bei einer Gesamtkonzentration von 428,5 µmol/L erzielt, wurde regressionsanalytisch aus der modellierten Konzentrations-Wirkungs-Beziehung eines Datensatzes (Datensatz A, vgl. Abb. 16, Kapitel 3.2.2) exemplarisch für die Mischung im EC01-Design ermittelt. In Abb. 32 ist der bei dieser Konzentration generierte Mischungseffekt den Effekten, die die Komponenten einzeln bei ihren jeweiligen Konzentrationen in der Mischung generieren, gegenüber gestellt. Selbst wenn die Komponenten in der Mischung in Konzentrationen vorliegen, die deutlich niedriger als ihre individuellen NOECs sind, ist der Mischungseffekt eindeutig höher als die Effekte der Einzelsubstanzen, und eine Kombinationswirkung liegt vor (Abb. 32).

Die Beobachtbarkeit der Kombinationswirkung für Komponenten, deren Konzentrationen in der Mischung gleich oder kleiner ihrer individuellen NOECs sind, stehen in Einklang mit dem Ergebnis einer Kombinations-Wirkungs-Studie einer Mischung, in der 14 strikt unähnlich wirkende Substanzen ebenfalls in ihren EC01 vorlagen und im Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* auf ihre Wirksamkeit getestet wurde. Bei einer Gesamtkonzentration von 266,3 µmol/L wurde ein Mischungseffekt von 15,2% erzielt, der darüber hinaus mit dem Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG prognostiziert werden konnte (Backhaus et al., 2000). Auch

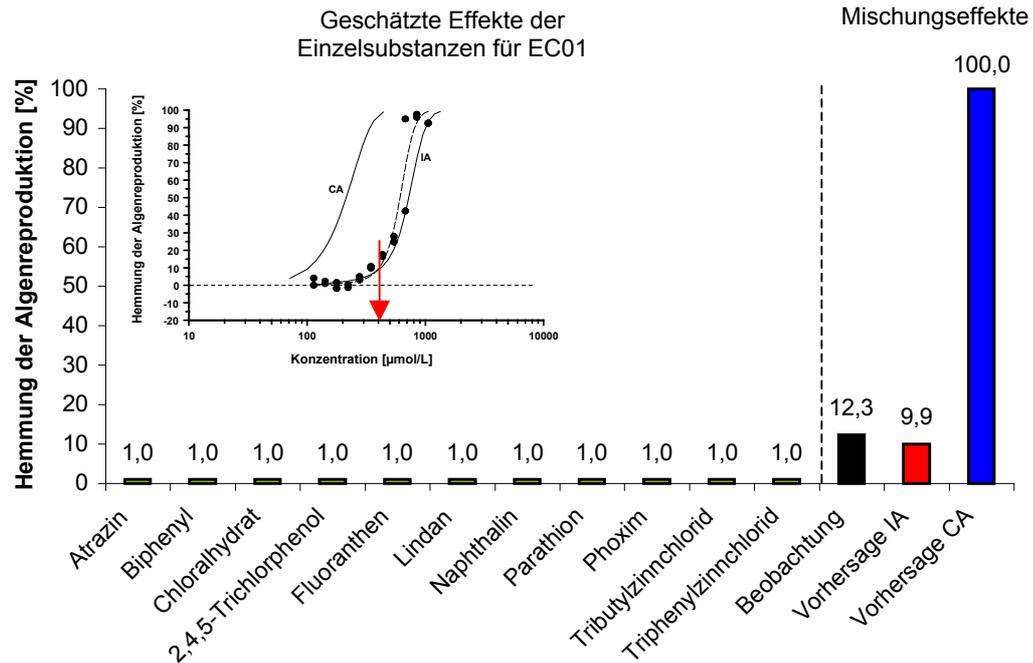


Abb. 32: Geschätzte Algentoxizität der Mischung im EC01-Design bei einer Gesamtkonzentration von 428,5  $\mu\text{mol/L}$ . Zusätzlich zur prognostizierten Mischungs- und Einzelstofftoxizität nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG sind die Effekte der Komponenten dargestellt, die diese einzeln bei den Konzentrationen, mit denen sie in der Mischung vorliegen, erzeugen.

Das Inlet zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung des Datensatzes A der Mischung im EC01-Design, dessen Modell für die regressionsanalytische Schätzung des Mischungseffektes bei einer Gesamtkonzentration von 428,5  $\mu\text{mol/L}$  (roter Pfeil) verwendet wurde.

Faust et al. (2000) fanden für eine Mischung aus 16 strikt unähnlich wirkenden Mischungskomponenten im Algentest (24h, Inhibition der Reproduktion) einen Mischungseffekt von 18,4%, der deutlich über den Effekten der Einzelstoffe von 1% lag, und ebenfalls nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG prognostizierbar war. Die im Widerspruch dazu stehenden Ergebnisse von Cassee et al. (1998) könnten darauf zurückzuführen sein, daß die Toxizitätsdaten für Ratten in einem akuten Toxizitätstest ermittelt wurden, wohingegen für die Ermittlung der Algentoxizitätsdaten ein chronischer Eingenerationen-Biotest verwendet wurde. Das wirft die Frage auf, ob die Expositionszeit von grundlegender Bedeutung für die ökotoxikologische Risikobewertung von Chemikalien ist. Der Einfluß der Expositionszeit auf die Intensität des beobachteten Mischungseffektes wurde von Altenburger und Backhaus (im Druck) untersucht, die berichteten, daß die Vorhersagbarkeit der Toxizität binärer Mischungen aus unähnlich wirkenden Industriechemikalien in Bakterien mit zunehmender Expositionszeit genauer wird.

Für die Berechnung des nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG zu erwartenden Effektes einer multiplen Mischung aus Komponenten, die in niedrigen Konzentrationen vorliegen, ist es

darüber hinaus notwendig, die relativ geringen Effekte, die die Einzelsubstanzen bei den niedrigen Konzentrationen generieren, mit hoher statistischer Sicherheit zu ermitteln. Die Vorhersage eines Effektes einer 10-Komponenten Mischung nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG in Höhe von z. B. 50% erfordert beispielsweise für jede Komponente als Einzelstoff eine zuverlässige Effektschätzung in der Region um 5% Effekt. Für die Berechnung der nach KONZENTRATIONSADDITIVITÄT zu erwartenden Konzentration, bei der die Mischung den selben Effekt von 50% erzeugt, ist nur die EC50 jedes Einzelstoffes erforderlich. Die vergleichsweise höheren Anforderungen an das experimentelle Design und an die zur Effektschätzung notwendige Modellierung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen könnten Gründe sein, weshalb Vorhersagen von Mischungseffekten nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG auf der Basis niedriger Effekte selten in der Literatur zu finden sind. Cassee et al. (1998) geben weder Informationen über die in ihrer Studie verwendeten Verfahren zur Effektschätzung, noch machen sie Angaben zur Qualität der ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Daten und der Einzelstoffe. In der vorliegenden Arbeit reichen die Effekte, die die Einzelsubstanzen des 11-Komponenten Gemisches bei ihren individuellen NOECs erzielen, von ca. 4% bis 13% (vgl. Abb. 13, Kapitel 3.2.1). Entsprechende Werte, die in Standardtoxizitätstests ermittelt wurden, reichen von 10% bis 30% (Moore und Caux, 1997). Vor dem Hintergrund, daß NOECs und die bei ihnen erzeugten Effekte erheblich vom experimentellen Design wie auch von der biologischen Variabilität des verwendeten Testsystems abhängen, sind die relativ niedrigen Effektwerte, die in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden, ein Indiz für die Qualität der ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Daten der Einzelstoffe. Um dieses Ziel zu erreichen wurde nicht nur ein experimentelles Design verwendet, welches den hohen Anforderungen an die Datenqualität Rechnung trägt (vgl. Kapitel 2.3.1 und 3.1.2), sondern wurden außerdem besondere Anstrengungen unternommen, die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen biometrisch zu modellieren (Grimme et al., 1998; Scholze et al., 2001). Ein solches Vorgehen könnte von besonderer Bedeutung sein, wenn die Effekte, die bei den individuellen NOECs der Einzelstoffe generiert werden, auf der Basis von modellierten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen geschätzt werden und niedrige Effekte zur Berechnung einer Prognose einer Mischungstoxizität nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG verwendet werden.

Für multiple Mischungen, wie sie im Freiland zu finden sein könnten, wurde die Irrelevanz von NOECs als Umweltstandard für Einzelstoffe, die immer auch als potentielle Komponenten einer Mischung zu betrachten sind, nicht nur in dieser Studie eindeutig gezeigt. Es ist zu bezweifeln, daß individuelle Grenzwerte generell auch in Form von Effekt- oder Benchmark-Konzentrationen unerwartete Effekte von Mischungen im Freiland ausschließen können.

# 5 Zusammenfassung



---

## 5 Zusammenfassung

Aquatische Organismen sind in der Regel nicht gegenüber einzelnen Chemikalien exponiert, sondern sind mehreren Substanzen gleichzeitig oder nacheinander ausgesetzt. Zur Vorhersage und Beurteilung der Toxizität von Stoffgemischen auf der Basis der Einzelstofftoxizitäten werden hauptsächlich zwei konkurrierende Konzepte diskutiert. Während das Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT auf der Vorstellung ähnlicher Wirkweisen der Mischungskomponenten beruht, basiert das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG auf der Annahme unähnlicher Wirkungsweisen der Komponenten als Ausgangspunkt für die Berechnung einer zu erwartenden Toxizität der Mischung. Aktuelle Untersuchungen belegen die prognostische Fähigkeit beider Konzepte, allerdings unter der Voraussetzung, daß die Wirkungsmechanismen der Mischungskomponenten bekannt sind. Für heterogene Mischungen aus Chemikalien, wie sie im Freiland vorliegen könnten, kann diese Voraussetzung nicht erfüllt werden. Die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen von Kombinationswirkungen heterogener Industriechemikalien werden als Evidenz dafür gewertet, daß das Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT generell als Referenzkonzept zur Vorhersage und Beurteilung der Kombinationswirkung von Mischungen verwendet werden kann, unabhängig von den Wirkungsmechanismen der Mischungskomponenten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit die Vorhersagbarkeit der Toxizität einer Mischung aus Substanzen untersucht, deren Wirkungsmechanismen größtenteils unbekannt sind. Da eine Mischungssituation unter Freiland- wie auch unter Laborbedingungen aber zusätzlich von einer Reihe biotischer und abiotischer Faktoren gekennzeichnet ist, wurde exemplarisch der Einfluß variierender Wasserstoffionenkonzentrationen auf die Vorhersage und Beurteilung der Kombinationswirkung der Mischung untersucht. Zusätzlich wurden Untersuchungen zu möglichen Ursachen der pH-Wert abhängigen Toxizität ionogener Substanzen durchgeführt. Die Regulierung von Chemikalien basiert bislang ausschließlich auf der Toxizitätsbeurteilung von einzelnen Substanzen und der Vorstellung der Gültigkeit von Konzentrationen, in denen die Substanzen als Einzelstoff keinen Effekt mehr generieren. Zur Klärung des Einflusses niedriger Effektkonzentrationen auf die Toxizität von Mischungen aus Chemikalien wurde untersucht, ob ein Substanzgemisch, deren Komponenten in Konzentrationen vorliegen, die gleich oder kleiner ihrer statistisch bestimmten Wirkungsschwellen sind, noch eine signifikante Toxizität erzeugt.

Aus insgesamt 186 Chemikalien einer Prioritätsliste (EEC Liste 1, Council Directive 76/464/EEC) wurden mittels eines chemometrischen Ansatzes 11 strukturunähnliche Substanzen mit überwiegend unbekanntem Wirkungsmechanismen als Komponenten der zu

testenden Mischung selektiert. Nach der Ermittlung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen aller Einzelstoffe in einem chronischen Biotest mit der einzelligen Grünalge *Scenedesmus vacuolatus* als Testorganismus und Inhibition der Reproduktion als Parameter der Toxizität, wurde die Toxizität der Mischung bei 3 unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen der Komponenten in Form von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bzw. für eine in multiplen Replikaten getesteten Mischungskonzentration bestimmt. Die beobachtete Mischungstoxizität wurde anschließend mit den Prognosen beider Konzepte, KONZENTRATIONSADDITIVITÄT und UNABHÄNGIGE WIRKUNG, deren Berechnung auf den Toxizitätsinformationen der Einzelstoffe beruht, verglichen und ihre Vorhersagbarkeit beurteilt. Die Stabilität der beobachteten Mischungstoxizität wurde geprüft, in dem die selbe Mischung in zusätzlichen Experimenten unter Weglassen von Komponenten als 9- oder 10-Komponenten Gemisch erneut getestet wurde. Zur Untersuchung des Einflusses des Milieufaktors pH auf die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung des Chemikaliengemisches wurde zuerst die pH-abhängige Toxizität der ionogenen Mischungskomponente, 2,4,5-Trichlorphenol (TCP), charakterisiert. Anschließend wurde die multiple Mischung bei veränderten pH-Wert-Bedingungen des Testmediums erneut getestet und die zu erwartende Toxizität unter Berücksichtigung der pH-abhängigen Toxizität von TCP berechnet. Zusätzlich wurde die unter Standardbedingungen beobachtete Toxizität der multiplen Mischung in Anbetracht der tatsächlichen pH-Wert-Bedingungen während der Mischungstestung reanalysiert. Abschließend wurde die pH-abhängige Toxizität ionogener Substanzen am Beispiel von Phenol-Derivaten analysiert, um deren Ursachen besser zu verstehen.

Die beobachtete Toxizität der Mischung aus 11 Chemikalien mit heterogenen Strukturen und größtenteils unbekanntem Wirkungsmechanismus ist präziser unter Verwendung des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG als mit dem Konzept der KONZENTRATIONSADDITIVITÄT vorhersagbar. Dies gilt insgesamt unabhängig vom Verhältnis der Konzentrationen, in denen die Komponenten in der Mischung vorliegen. Die Abweichung zwischen den beobachteten und nach UNABHÄNGIGER WIRKUNG vorhergesagten Effekten höherer Konzentrationen der Mischung ist in Abhängigkeit vom Mischungsdesign mit dem Einfluß des Milieufaktors pH und der pH-abhängigen Toxizität von TCP zu erklären. Werden die tatsächlichen pH-Wert-Bedingungen während der Mischungstestung bei der Berechnung der Effektprognose berücksichtigt, ist die beobachtete Mischungstoxizität mit Einschränkungen für den *gesamten* Konzentrationsbereich der Mischung mit dem Modell der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG vorhersagbar. Es konnte ferner gezeigt werden, daß die beobachtete Mischungstoxizität nicht unter Annahme eines gemeinsamen, narkotischen Wirkungsmechanismus der Komponenten erklärt werden kann. Dieses Ergebnis zusammen

mit der demonstrierten Stabilität der Mischungstoxizität sind Indizien dafür, daß die Wirkungsmechanismen der Mischungskomponenten in einer Weise unähnlich sind, die die Verwendung des Konzeptes der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG als Referenzkonzept zur Beurteilung der beobachteten Kombinationswirkung rechtfertigt. Für die Vorhersage und Beurteilung der Kombinationswirkung von Mischungen aus Umweltchemikalien sollte das Konzept der UNABHÄNGIGEN WIRKUNG zukünftig in Betracht gezogen werden. Liegen die Komponenten der Mischung in Konzentrationen vor, die kleiner oder gleich der individuellen NOECs der Einzelstoffe sind, ist eine Toxizität zu beobachten, die deutlich über den Effekten der Einzelstoffe liegt. Damit wurde gezeigt, daß Grenzwerte in Form von NOECs zur Vermeidung unerwarteter Effekte von Mischungen untauglich sind.

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Relevanz des Milieufaktors pH für die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung des untersuchten multiplen Gemisches zeigen, daß der pH-Wert über die pH-abhängige Toxizität von TCP einen deutlichen Einfluß auf die *Intensität* und die *Vorhersagbarkeit* und *Beurteilung* der Kombinationswirkung der multiplen Mischung hat. Ionogene Mischungskomponenten mit pKs-Werten, die für das pH-Fenster des verwendeten Testprotokolls relevant sind, sollten daher auf ihre pH-abhängige Toxizität untersucht, diese charakterisiert und bei der Berechnung der zu erwartenden Mischungstoxizität berücksichtigt werden. Ein solches Vorgehen kann zu einer deutlichen Verbesserung der Validität der Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkung des betreffenden Chemikaliengemisches führen.

Die Untersuchungen zu den Ursachen der pH-abhängigen Toxizität ionogener Chlorphenole ergeben insgesamt ein heterogenes Bild. Die Ergebnisse der pH-Wert-abhängigen Toxizität können weder für alle Substanzen einheitlich noch für alle Substanzen eindeutig entweder im Sinne einer alleinigen Wirksamkeit der undissoziierten Form oder im Sinne einer Beteiligung der Wirkung der dissoziierten Form an der Gesamtwirkung bzw. im Sinne eines konzentrationsadditiven Zusammenwirkens der Spezies interpretiert werden. Gleichwohl überwiegen für einige Substanzen die Hinweise für die undissoziierte Form als einzig effektive Komponente, während für andere Substanzen die Indizien für die konkurrierende Annahme der Beteiligung der dissoziierten Form an der Gesamtwirkung überwiegen. Ferner gibt es Hinweise, daß die Art und die Intensität der Kombinationswirkung der dissoziierten und der undissoziierten Form einiger Substanzen unter gewissen Bedingungen für bestimmte pH-Werte unterschiedlich ist. Für Mischungen unter Beteiligung solcher Substanzen könnte ihre Kombinationswirkung nicht nur hinsichtlich ihrer *Intensität* sondern auch bezüglich ihrer *Qualität* bei verschiedenen pH-Werten unterschiedlich sein. Die tatsächliche Relevanz der Art des Zusammenwirkens der dissoziierten und undissoziierten

Form für die Vorhersagbarkeit und Beurteilung der Kombinationswirkungen von Gemischen aus ionogenen und nicht-ionogenen Substanzen müsste aber erst noch gezeigt werden.

# 6 Literatur



---

## 6 Literaturverzeichnis

- Alabaster JS, Lloyd R (1980). Water quality criteria for freshwater fish. London, Butterworths.
- Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, Faust M, Scholze M, Grimme LH (2000). Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ Toxicol Chem* 19(9): 2341-2347.
- 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 (1996). Regulations for combined effects of pollutants: consequences from risk assessment in aquatic toxicology. *Food Chem Toxicol* 34: 1155-1157.
- Asano S, Nagasawa S, Fushimi S (1969). Biological trials of chemicals on fish. VI. Relation between temperature and the toxicity of pentachlorophenol (PCP) to carp. *Bochu-Kagaku* 34: 13-21.
- Ashford JR (1958). Quantal responses to mixtures of poisons under conditions of simple similar action. The analysis of uncontrolled data. *Biometrika* 45: 74-88.
- Auton TR (1994). Calculation of benchmark doses from teratology data. *Regul Toxicol Pharmacol* 19: 152-167.
- Backhaus T, Altenburger R, Boedeker W, Faust M, Scholze M, Grimme LH (2000). Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *vibrio fischeri*. *Environ Toxicol Chem* 19(9): 2348-2356.
- Barrett M (1993). Interactions of herbicides and other agrochemicals in plants: interactions in mixtures with other herbicides and with safeners, fungicides, insecticides, and nematicides. In: *Pesticide interactions in crop production: beneficial and deleterious effects*. Altman J (ed), London, Tokyo, CRC Press.
- Bender ME (1969). The toxicity of the hydrolysis and breakdown products of malathion to the fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque). *Water Res* 3: 571-582.
- Berenbaum MC (1985). The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J Theor Biol* 114: 413-431.
- 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. *ACES* 4 (3): 45-53.
- Bol J, Verhaar H, van Leeuwen CJ, Hermens JLM (1993a). Predictions of the aquatic toxicity of high-production-volume-chemicals, Part A: Introduction and methodology, Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, Zoetermeer.
- Bol J, Verhaar H, van Leeuwen CJ, Hermens JLM (1993b). Predictions of the aquatic toxicity of high-production-volume-chemicals, Part B: Predictions, Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, Zoetermeer.
- Brack W, Altenburger R, Ensenbach U, Möder M, Segner H, Schüürmann G (1999). Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bittfeld (Germany) – A contribution to hazard assessment. *Arch Environ Toxicol* 37: 164-174.
- Broderius SJ, Kahl MD (1985). Acute toxicity of organic chemical mixtures to the fathead minnow. *Aquatic Toxicol* 6: 307-322.
- Broderius SJ, Kahl MD, Hoglund MD (1995). Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 14: 1591-1605.

- Broderius SJ, Smith LL, Jr, Lind DT (1977). Relative toxicity of free cyanide and dissolved sulfide forms to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *J Fish Res Bd Can* 34: 2323-2332.
- Calamari D, Vighi M (1992). A proposal to define quality objectives for aquatic life for mixtures of chemical substances. *Chemosphere* 25: 531-542.
- Cassee FR, Groten JP, van Bladeren PJ, Feron VJ (1998). Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Critical Rev Toxicol* 28: 73-101.
- Chapman PM, Chapman PF, Caldwell RS (1996). A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environ Toxicol Chem* 15: 77-79.
- Colby SR (1967). Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. *Weeds* 15: 20-22.
- Cole DR, Plapp, Jr. FW (1974). Inhibition of growth and photosynthesis in *Chlorella pyrenoidosa* by a polychlorinated biphenyl and several insecticides. *Environ Entomol* 3(2): 217-220.
- Consolaro F, Gramatica P, Walter H, Altenburger R (2000). Ranking of "EEC priority list 1" for structural similarity and modelling of algal toxicity. Poster presentation at the 8<sup>th</sup> annual meeting of SETAC Europe, Brighton.
- Crandall CA, Goodnight CJ (1959). The effect of various factors on the toxicity of sodium pentachlorophenate to fish. *Limnol Oceanogr* 4: 53-56.
- Crump KS (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: 79-88.
- CSTE/EEC (1994). Scientific Advisory Committee Activity Report published by the Commission of the European Communities, Office for Official Publication of the E.C., Luxembourg: EUR (1992-1993).
- Dalela RC, Saroj Rani, Sarita Rani, Verma SR (1980). Influence of pH on the toxicity of phenol and its two derivatives pentachlorophenol and dinitrophenol to some fresh water teleosts. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 8: 623-629.
- 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.
- Diamond SA, Mount DR, Burkhard LP, Ankley GT, Makynen EA, Leonard EN (2000). Effect of irradiance spectra on the photoinduced toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem* 19(5): 1389-1396.
- Doudoroff P, Leduc G, Schneider CR (1966). Acute toxicity to fish of solutions containing complex metal cyanides, in relation to concentrations of molecular hydrocyanic acid. *Trans Am Fish Soc* 95: 6-22.
- Dunnett CW (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *JASA* 50: 1096-1121.
- 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.
- Escher BI, Hunziker R, Schwarzenbach RP, Westall JC (1999). Kinetic model to describe the intrinsic uncoupling activity of substituted phenols in energy transducing membranes. *Environ Sci Technol* 33: 560-570.
- Fargasova A (1997). Comparative study of ecotoxicological effect of triorganotin compounds on various biological subjects. *Ecotoxicol Environ Saf* 36: 38-42.
- Fargasova A (1998). Comparison of tributyltin compound effects on the alga *Scenedesmus quadricauda* and the benthic organisms *Tubifex tubifex* and *Chironomus plumosus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 41: 222-230.
- 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, Backhaus T, Bödeker W, Scholze M, Grimme LH (2000). Predictive assessment of the aquatic toxicity of multiple chemical mixtures. *J Environ Qual* 29: 1063-1068.
- Faust M, Altenburger R, Bödecker W, Grimme LH (1992). Algentoxizitätstests mit synchronisierten Kulturen. In: *Biologische Testverfahren*. Steinhäuser KG, Hansen P-D (Hrsg.). Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag.
- Feron VJ, Cassee FR, Groten JP (1998). Toxicology of chemical mixtures: International perspective. *Environ Health Persp Suppl* 106: 1281-1289.
- Finkelstein A (1970). *Biochim Biophys Acta* 205: 1-6.
- Finney DJ (1942). The analysis of toxicity tests on mixtures of poisons. *Ann Appl Biol* 29: 82-94.
- Frehse H (eds.) (1991). *Pesticide Chemistry. Advances in International Research, Development, and Legislation*. 1<sup>st</sup> Edition. Proceedings of the Seventh International Congress of Pesticide Chemistry (IUPAC), Hamburg 1990. Weinheim, VCH-Verlag.
- Gala WR, Giesy JP (1992). Photo-induced toxicity of anthracene to the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Arch. Environ Contam Toxicol* 23: 316-323.
- Geyer H, Scheunert I, Korte F (1985). The effects of organic environmental chemicals on the growth of the alga *Scenedesmus subspicatus*: a contribution to environmental biology. *Chemosphere* 14(9): 1355-1369.
- Gramatica P, Consolaro F (1999). Ranking of EEC priority list 1 compounds by structural similarity. Poster presentation at the 9<sup>th</sup> annual meeting of SETAC Europe, Leipzig.
- Gramatica P, Vighi M, Consolaro F, Todeschini R, Finizio A, Faust M (2001). QSAR approach for the selection of congeneric compounds with a similar toxicological mode of action. *Chemosphere* 42: 873-883.
- Grimme LH, Altenburger R, Backhaus T, Bödeker W, Faust M, Scholze M (1998). Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen. Multiple Kombinationen von unähnlich wirkenden Substanzen in niedrigen Konzentrationen. UFZ-Bericht Nr. 25/1998, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Leipzig.
- 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(3): 150-158.
- Grimme LH, Boardman NK (1972). Photochemical activities of a partial fraction p1 obtained from the green algae *Chlorella fusca*. *Biochem Biophys Res Commun* 49: 1617-1623.
- 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.
- Hansch C, Kim D, Leo A, Novellino E, Silipo C, Vittoria A (1989). Toward a quantitative comparative toxicology of organic compounds. *CRC Critical Rev Toxicol* 19(3): 185-226.
- Henschler D, Bolt HM, Jonker D, Pieters MN, Groten JP (1996). Experimental design and risk assessment in combination toxicology: Panel discussion. *Food Chem Toxicol* 34: 1183-1185.
- 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, Wegmann 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.
- 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 sub-lethal 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*. *Aquat 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 (1985c). Joint toxicity of mixtures of groups of organic aquatic pollutants to the guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol Environ Saf* 9: 321-326.
- Hodson PV, Sprague JB (1975). Temperature-induced changes in acute toxicity of zinc to Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Fish Res Bd Can* 32: 1-10.
- Hoekstra JA, Van Ewijk PH (1993). Alternatives for the no-observed-effect level. *Environ Toxicol Chem* 12: 187-194.
- Hoeven Nvd (1997). How to measure no effect, Part III: Statistical aspects of NOEC and ECx estimates. *Environmetrics* 8: 255-261.
- Holcombe GW, Fiandt JT, Phipps GL (1980). Effects of pH increases and sodium chloride additions on the acute toxicity of 2,4-dichlorophenol to the fathead minnow. *Wat Res* 14: 1073-1077.
- Huang G, Bai Z, Dai S, Xie Q (1993). Accumulation and toxic effect of organometallic compounds on algae. *Appl. Organomet. Chem.* 7(6): 373-380.
- ISIS/Base. Revision 1.2.1. MDL Information Systems, Inc. 1990-1994.
- ISO/DIN 6341 (1996). Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test.
- ISO/DIN 8692 (1991). Wachstumstesthemmtest mit den Süßwasseralgen *Scenedesmus subspicatus* und *Selenastrum capricornutum*.
- Johnson DW (1968). Pesticides and fishes – A review of selected literature. *Trans Am Fish Soc* 97: 398-424.
- Jonker D, Wouterson RA, Feron VJ (1996). Toxicity of mixtures of nephrotoxicants with similar or dissimilar mode of action. *Food Chem Toxicol* 34: 1075-1082.
- Kauss PB, Hutchinson TC (1975). The effects of water-soluble petroleum components on the growth of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Environ Pollut* 9(3): 157-174.
- Kishino T, Kobayashi K (1995). Relation between toxicity and accumulation of chlorophenols at various pH, and their absorption mechanism in fish. *Wat Res* 29(2): 431-442.
- 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.
- Könemann H, Musch A (1981). Quantitative structure-activity relationships in fish toxicity studies. Part 2: The influence of pH on the QSAR of chlorophenols. *Toxicol* 19: 223-228.
- Korte F (1992). *Lehrbuch der ökologischen Chemie: Grundlagen und Konzepte für die ökologische Beurteilung von Chemikalien*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Küsel AC, Sianoudis J, Leibfritz D, Grimme LH, Mayer A (1990). The dependence of the cytoplasmatic pH in aerobic and anaerobic cells of the green algae *Chlorella fusca* and *Chlorella vulgaris* on the pH of the medium as determined by <sup>31</sup>P *in vivo* NMR spectroscopy. *Arch Microbiol* 153: 254-258.
- Kugel H (1988). <sup>31</sup>P- und <sup>23</sup>Na-kernspinresonanzspektroskopische Untersuchungen des Energiemetabolismus der euryhalinen Mikroalge *Platymonas subcordiformis*. Dissertation Universität Bremen.
- Lampert W, Sommer U (1993). *Limnökologie*. Stuttgart, Thieme Verlag.
- Lane AE, Burris JE (1981). Effects of environmental pH on the internal pH of *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus quadricauda*, and *Euglena mutabilis*. *Plant Physiol* 68: 439-442.

- Laskowski R (1995). Some good reasons to ban the use of NOEC, LOEC and related concepts in ecotoxicology. OIKOS 73: 140-144.
- Lipnick RL (1995). Structure-activity relationships. In: Fundamentals of aquatic toxicology. 2<sup>nd</sup> edition. Rand GR (ed). London, Taylor & Francis.
- Lipnick RL, Johnson DE, Gilford JH, Bickings CK, Newsome LD (1985). Comparison of fish toxicity screening data for 55 alcohols with the quantitative structure activity relationship prediction of minimum toxicity for nonreactive nonelectrolyte organic compounds. Environ Toxicol Chem 4: 281-296.
- Lipnick RL, Watson KR, Strausz AK (1987). A QSAR study of the acute toxicity of some industrial organic chemicals to goldfish. Narcosis, electrophile and proelectrophile mechanisms. Xenobiotica 17(8): 1011-1025.
- 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, Muischnek H (1926). Über Kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. Naunyn-Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol 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: Synchrony in cell division and growth. Zeuthen E (ed). New York, Wiley.
- Marking LL (1975). Effects of pH on toxicity of antimycin to fish. J Fish Res Bd Can 32: 769-773.
- Marking LL (1977). Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. In: Aquatic toxicology and hazard evaluation. Mayer FL, Hemelink JL (eds). ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials.
- Marking LL, Bills TD (1976). Toxicity of rotenone to fish in standardized laboratory tests. U.S. Dept Inter Fish Wildl Serv Invest Fish Control No. 72.
- McLeay DJ, Walden CC, Munro JR (1979). Effect of pH on toxicity of kraft pulp and paper mill effluent to salmonid fish in fresh and seawater. Water Res 13: 249-254.
- Millemann RE, Birge WJ, Black JA, Cushman RM, Daniels KL, Franco PJ, Giddings JM, (1984). Comparative acute toxicity to aquatic organisms of components of coal-derived synthetic fuels. Trans Am Fish Soc 113(1): 74-85.
- Moore DRJ, Caux P-Y (1997). Estimating low toxic effects. Environ Toxicol Chem 16: 794-801.
- Mostafa IY, Shabana EF, Khalil Z, Mostafa FIY (1991). The metabolic fate of 14c-parathion by some fresh water phytoplankton and its possible effects on the algal metabolism. J Environ Sci Health B26(5/6): 499-512.
- OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 23.
- OECD 201. Guideline for testing of chemicals: Alga, growth inhibition test. Updated guideline, adopted 7<sup>th</sup> June, 1984.
- OECD 202. Guideline for testing of chemicals: *Daphnia* sp. Acute immobilisation test and reproduction test. Updated guideline, adopted 4th April, 1984.
- OECD 203. Guideline for testing of chemicals: Fish, acute toxicity test. Updated guideline, adopted 17th July, 1992.
- OECD 204. Guideline for testing of chemicals: Fish, prolonged toxicity test: 14-day study. Updated guideline, adopted 4th April, 1984.
- OECD 210. Guideline for testing of chemicals: Fish, early-life stage toxicity test. Updated guideline, adopted 17th July, 1992.
- OECD 211. Guideline for testing of chemicals: *Daphnia magna* reproduction test. Updated guideline, adopted 21th September, 1998.

- OECD 215. Guideline for testing of chemicals: Fish, juvenile growth test. Updated guideline, adopted 21th January, 2000.
- Pape-Lyndstrom PA, Lydy MJ (1997). Synergistic toxicity of atrazine and organophosphate insecticides contravenes the response addition mixture model. *Environ Toxicol Chem* 11: 2415-2420.
- Pickering QH, Henderson C (1966). Acute toxicity of some important petrochemicals to fish. *J Water Pollut Control Fed* 38: 1419-1429.
- 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 (1967). A comparison of models for quantal responses to mixtures of drugs. *Biometrics* 23: 27-44.
- Pösch G, Juan H (1985). *Allgemeine Pharmakodynamik*. Stuttgart, New York. Thieme Verlag.
- Pösch G (1993). *Combined effects of drugs and toxic agents. Modern evaluation in theory and practice*. Wien, New York. Springer.
- Ramos EU, Vaes WHJ, Mayer P, Hermens JLM (1999). Algal growth inhibition of *Chlorella pyrenoidosa* by polar narcotic pollutants: toxic cell concentrations and QSAR modelling. *Aquat Toxicol* 46 (1): 1-10.
- Richardson ML, Gangolli S (eds)(1994). *The dictionary of substances and their effects*. Cambridge. The royal society of chemistry.
- Roos A, Boron FW (1981). Intracellular pH. *Physiol Reviews* 61: 296-434.
- Russo RC, Thurston RV, Emerson K (1981). Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Effects of pH, nitrite species, and anion species. *Can J Fish Aquat Sci* 38: 387-393.
- Saarikoski J, Viluksela M (1981). Influence of pH on the toxicity of substituted phenols to fish. *Arch environ contam Toxicol* 10: 747-753.
- Sano H (1976). The role of pH on the acute toxicity of sulfite in water. *Water Res* 10: 139-142.
- Schafer H, Hettler H, Fritsche U, Pitzen G, Roderer G, Wenzel A (1994). Biotests using unicellular algae and ciliates for predicting long-term effects of toxicants. *Ecotoxicol Environ Saf* 27(1): 64-81.
- Scholze M, Bödeker W, Faust M, Backhaus T, Altenburger R, Grimme LH (2001). Best-fit regression estimation of low effect concentrations. *Environ Toxicol Chem* 20(2): 448-457.
- Schüürmann G, Rayasamuda K, Somashekar, Kristen U (1996). Structure-activity relationships for chloro- and nitrophenol toxicity in the pollen tube growth test. *Environ Toxicol Chem* 15(10): 1702-1708.
- Schüürmann G (1998) Ecotoxic modes of action of chemical substances. In: *Ecotoxicology: ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects*. Schüürmann G, Markert B (Eds). New York, Weinheim: Wiley; Heidelberg, Berlin. Spektrum Akad. Verl.
- Schüürmann G, Altenburger R, Segner H (1999). *Umweltchemie 1998: Ökotoxikologie*. *Nachr Chem Tech Lab* 47(3): 295-302.
- Sills JB, Allen JL (1971). The influence of pH on the efficacy and residues of quinaldine. *Trans Am fish Soc* 100: 544-545.
- Slonin AR (1977). Acute toxicity of selected hydrazines to the common guppy. *Water Res* 11: 889-895.
- Sprague JB (1970). Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Res* 4: 3-32.
- Sprague JB (1985). Factors that modify toxicity. In: *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Rand GM, Petrocelli SR (eds). Washington. Hemisphere Publishing Corporation.

- Streffer C, Bücker J, Cansier A, Cansier D, Gethmann CF, Guderian R, Hanekamp G, Henschler D, Pösch G, Rehbindler E, Renn O, Slesina M, Wuttke K (2000). Umweltstandards: Kombinierte Expositionen und ihre Auswirkungen auf den Menschen und seine Umwelt. Berlin, Heidelberg, New York. Springer.
- Streit, B (1994). Lexikon der Ökotoxikologie. Weinheim. VCH.
- 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.
- Terada H (1990). Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ Health* 87: 213-218.
- Thomas RG (1990). Volatilization from water. In: Handbook of chemical property estimation methods: environmental behavior of organic compounds. Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH (eds). American Chemical Society, Washington, DC.
- Tomlin CDS (ed) (1997). The pesticide manual. 11<sup>th</sup> Edition. Farnham, Surrey. British Crop Protection Council.
- UBA (Umweltbundesamt) (1999). Dokumentation wassergefährdender Stoffe – Datenblattsammlung: Grundwerk mit 3. Ergänzungslieferung Stand: Juni 1998. Stuttgart. Hirzel.
- U.S.-EPA (Environmental Protection Agency) (1978). In-depth studies on health and environmental impacts of selected water pollutants. Contract No. 68-01-4646, U.S. EPA, Duluth, MN.
- 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 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. Dordrecht. Kluwer.
- Veith G, Broderius S (1990). Rules for distinguishing toxicants that cause type 1 and type 2 narcosis syndromes. *Environ Health Persp* 87: 207-211.
- Verhaar HJM, Van Leeuwen CJ, Bol J, Hermens JLM (1993). Application of QSARs in risk management of existing chemicals. In: Predictions of the aquatic toxicity of high-production-volume-chemicals. Part A: Introduction and methodology. Bol J, Verhaar HJM, Van Leeuwen CJ, Hermens JLM (eds). Ministerie van Volkshuisvesting, Nr. 9A.
- Verhaar HJM, Van Leeuwen CJ, Hermens HJLM (1992). Classifying environmental pollutants. 1: Structure-activity relationships for prediction of aquatic toxicity. *Chemosphere* 25: 471-491.
- Vighi M, Altenburger R, Arrhenius Å, Backhaus T, Bødeker W, Blanck H, Consolaro F, Faust M, Finizio A, Froehner K, Gramatica P, Grimme LH, Grönvall F, Hamer V, Scholze M, Walter H (submitted). Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: problems and perspectives. *Ecotoxicol Environ Saf*.
- Walter H, Consolaro F, Gramatica P, Scholze M, Altenburger R (accepted). Mixture toxicity of priority pollutants at no observed effect concentrations (NOECs). *Ecotoxicology*.
- Weich HA (1983). Strukturelle und biochemische Untersuchungen während der De- und Regenerationsphase von *Chlorella fusca* nach Behandlung mit dem Bleichherbizid Metflurazon. Diplomarbeit, Universität Bremen.
- Yang RSH, Thomas RS, Gustafson DL, Campain J, Benjamin SA, Verhaar HJM, Mumtaz MM (1998). Approaches to developing alternative and predictive toxicology based on PBPK/PD and QSAR modeling. *Environ Health Perspect* 106 Suppl.: 1385-1393.



# 7 Anhang



## 7 Anhang

### KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-DATEN DER EINZELSTOFFE

Substanz	CAS RN	Konzentration	Hemmung der
		[ $\mu\text{mol/L}$ ]	Algenreproduktion [%]
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,571	98,084
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,439	89,498
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,338	58,480
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,260	36,266
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,200	26,200
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,154	18,719
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,118	12,103
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,091	7,763
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,070	4,126
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,054	3,121
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,041	2,881
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,032	-2,729
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,571	82,364
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,439	63,888
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,338	36,429
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,260	30,159
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,200	30,255
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,154	20,034
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,118	2,649
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,070	0,108
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,054	-2,311
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,041	3,206
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,032	-1,081
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,571	99,287
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,439	93,335
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,338	72,847
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,260	46,889
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,200	30,564
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,154	26,471
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,118	5,883
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,091	5,047
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,070	3,252
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,054	2,780
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,041	2,757
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	0,032	2,672
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	Kontrolle	-6,543
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	Kontrolle	0,134
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	Kontrolle	6,262
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	Kontrolle	0,041
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	Kontrolle	-2,961
Triphenylzinn chlorid	639-58-7	Kontrolle	3,066
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,399	97,217
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,307	80,348
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,236	48,600
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,182	31,696
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,140	20,514

Substanz	CAS RN	Konzentration	Hemmung der
		[ $\mu\text{mol/L}$ ]	Algenreproduktion [%]
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,108	12,651
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,083	8,701
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,064	7,124
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,049	3,407
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,038	1,763
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,029	-1,156
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,022	-2,236
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,399	86,169
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,307	52,004
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,236	33,272
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,182	33,100
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,140	17,975
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,108	9,854
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,083	8,167
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,064	5,867
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,049	1,211
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,038	0,267
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,029	-1,408
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,022	1,236
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,399	90,247
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,307	49,397
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,236	34,542
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,182	16,656
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,140	16,631
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,108	13,877
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,083	8,590
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,064	5,119
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,049	2,463
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,038	1,512
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,029	3,426
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	0,022	6,848
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	Kontrolle	-5,818
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	Kontrolle	-3,781
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	Kontrolle	-1,162
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	Kontrolle	0,880
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	Kontrolle	4,002
Tributylzinn chlorid	1461-22-9	Kontrolle	5,879
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,962	19,413
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,875	6,669
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,795	-0,435
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,723	-5,738
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,657	-2,684
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,597	-12,407
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,543	-7,667
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,494	-4,911
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,449	-8,880
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,408	-11,581
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,371	-11,360
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,337	-8,218
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,962	36,974
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,875	14,893

Substanz	CAS RN	Konzentration [µmol/L]	Hemmung der Algenreproduktion [%]
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,795	1,913
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,723	-0,623
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,657	-4,007
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,597	0,331
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,543	-6,289
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,494	-2,084
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,449	-5,628
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,408	-7,392
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,371	-1,284
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,337	1,119
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,962	43,677
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,875	22,081
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,795	9,668
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,723	5,093
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,657	1,692
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,597	-1,439
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,543	-1,009
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,494	-4,856
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,449	-1,891
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,408	-3,919
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,371	-1,874
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,337	-1,025
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Kontrolle	-0,524
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Kontrolle	-3,021
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Kontrolle	3,351
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Kontrolle	3,026
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Kontrolle	1,582
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Kontrolle	-4,415
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	1,122	29,184
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	1,068	30,357
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	1,017	27,804
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,969	23,753
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,923	20,959
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,879	13,175
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,797	17,662
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,723	6,412
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,656	5,923
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,595	4,466
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,539	3,971
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,489	2,562
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	1,122	62,710
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	1,068	44,166
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	1,017	38,524
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,969	36,430
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,923	15,292
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,879	14,921
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,797	17,751
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,723	9,254
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,656	8,559
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,595	6,412
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,539	5,062

Substanz	CAS RN	Konzentration	Hemmung der
		[ $\mu\text{mol/L}$ ]	Algenreproduktion [%]
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,489	9,549
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	1,122	48,760
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	1,068	39,491
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	1,017	33,453
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,969	19,632
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,923	15,652
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,879	13,977
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,797	13,541
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,723	7,255
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,656	9,980
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,595	7,332
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,539	9,891
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	0,489	3,706
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Kontrolle	-1,477
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Kontrolle	-1,725
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Kontrolle	1,218
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Kontrolle	-0,386
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Kontrolle	-0,256
2,4,5-Trichlorphenol	95-95-4	Kontrolle	2,627
Naphtalin	91-20-3	32,997	49,950
Naphtalin	91-20-3	29,461	35,600
Naphtalin	91-20-3	26,305	30,860
Naphtalin	91-20-3	23,486	27,560
Naphtalin	91-20-3	20,970	14,890
Naphtalin	91-20-3	18,723	21,810
Naphtalin	91-20-3	16,717	11,940
Naphtalin	91-20-3	14,926	4,280
Naphtalin	91-20-3	11,899	2,410
Naphtalin	91-20-3	9,486	1,010
Naphtalin	91-20-3	7,562	-0,130
Naphtalin	91-20-3	6,028	1,960
Naphtalin	91-20-3	32,997	71,670
Naphtalin	91-20-3	29,461	53,450
Naphtalin	91-20-3	26,305	37,120
Naphtalin	91-20-3	23,486	31,880
Naphtalin	91-20-3	20,970	29,660
Naphtalin	91-20-3	18,723	20,820
Naphtalin	91-20-3	16,717	14,480
Naphtalin	91-20-3	14,926	10,170
Naphtalin	91-20-3	11,899	5,570
Naphtalin	91-20-3	9,486	3,310
Naphtalin	91-20-3	7,562	1,800
Naphtalin	91-20-3	6,028	1,910
Naphtalin	91-20-3	32,997	68,210
Naphtalin	91-20-3	29,461	57,760
Naphtalin	91-20-3	26,305	44,100
Naphtalin	91-20-3	23,486	34,610
Naphtalin	91-20-3	20,970	25,670
Naphtalin	91-20-3	18,723	20,650
Naphtalin	91-20-3	16,717	17,250
Naphtalin	91-20-3	14,926	8,060

Substanz	CAS RN	Konzentration	Hemmung der
		[ $\mu\text{mol/L}$ ]	Algenreproduktion [%]
Naphtalin	91-20-3	11,899	9,280
Naphtalin	91-20-3	9,486	3,990
Naphtalin	91-20-3	7,562	2,770
Naphtalin	91-20-3	6,028	2,460
Naphtalin	91-20-3	Kontrolle	-2,350
Naphtalin	91-20-3	Kontrolle	-1,930
Naphtalin	91-20-3	Kontrolle	2,160
Naphtalin	91-20-3	Kontrolle	-2,020
Naphtalin	91-20-3	Kontrolle	0,100
Naphtalin	91-20-3	Kontrolle	4,030
Naphtalin	91-20-3	39,651	86,118
Naphtalin	91-20-3	33,042	58,542
Naphtalin	91-20-3	27,535	37,551
Naphtalin	91-20-3	22,946	21,533
Naphtalin	91-20-3	19,122	14,273
Naphtalin	91-20-3	15,935	15,986
Naphtalin	91-20-3	13,279	9,828
Naphtalin	91-20-3	11,066	7,871
Naphtalin	91-20-3	7,685	5,750
Naphtalin	91-20-3	5,337	2,447
Naphtalin	91-20-3	3,706	4,241
Naphtalin	91-20-3	2,574	1,060
Naphtalin	91-20-3	39,651	92,920
Naphtalin	91-20-3	33,042	73,973
Naphtalin	91-20-3	27,535	47,025
Naphtalin	91-20-3	22,946	30,219
Naphtalin	91-20-3	19,122	16,516
Naphtalin	91-20-3	15,935	14,233
Naphtalin	91-20-3	13,279	15,986
Naphtalin	91-20-3	11,066	8,727
Naphtalin	91-20-3	7,685	6,117
Naphtalin	91-20-3	5,337	5,546
Naphtalin	91-20-3	3,706	4,119
Naphtalin	91-20-3	2,574	2,569
Naphtalin	91-20-3	39,651	94,857
Naphtalin	91-20-3	33,042	72,827
Naphtalin	91-20-3	27,535	43,436
Naphtalin	91-20-3	22,946	26,414
Naphtalin	91-20-3	19,122	22,511
Naphtalin	91-20-3	15,935	18,596
Naphtalin	91-20-3	13,279	16,313
Naphtalin	91-20-3	11,066	11,827
Naphtalin	91-20-3	7,685	7,463
Naphtalin	91-20-3	5,337	3,059
Naphtalin	91-20-3	3,706	4,078
Naphtalin	91-20-3	2,574	2,325
Naphtalin	91-20-3	Kontrolle	-2,447
Naphtalin	91-20-3	Kontrolle	1,346
Naphtalin	91-20-3	Kontrolle	-0,408
Naphtalin	91-20-3	Kontrolle	2,039
Naphtalin	91-20-3	Kontrolle	-0,530

Substanz	CAS RN	Konzentration	Hemmung der
		[ $\mu\text{mol/L}$ ]	Algenreproduktion [%]
Fluoranthen	206-44-0	0,125	89,580
Fluoranthen	206-44-0	0,109	79,842
Fluoranthen	206-44-0	0,095	41,480
Fluoranthen	206-44-0	0,082	25,150
Fluoranthen	206-44-0	0,072	16,939
Fluoranthen	206-44-0	0,062	12,989
Fluoranthen	206-44-0	0,047	7,051
Fluoranthen	206-44-0	0,036	3,721
Fluoranthen	206-44-0	0,027	1,213
Fluoranthen	206-44-0	0,020	-2,091
Fluoranthen	206-44-0	0,125	89,462
Fluoranthen	206-44-0	0,109	65,207
Fluoranthen	206-44-0	0,095	47,368
Fluoranthen	206-44-0	0,082	18,264
Fluoranthen	206-44-0	0,072	26,685
Fluoranthen	206-44-0	0,062	15,648
Fluoranthen	206-44-0	0,047	16,184
Fluoranthen	206-44-0	0,036	8,913
Fluoranthen	206-44-0	0,027	4,786
Fluoranthen	206-44-0	0,020	4,660
Fluoranthen	206-44-0	0,015	-1,043
Fluoranthen	206-44-0	0,012	-0,020
Fluoranthen	206-44-0	0,125	77,276
Fluoranthen	206-44-0	0,109	53,968
Fluoranthen	206-44-0	0,095	33,529
Fluoranthen	206-44-0	0,082	19,262
Fluoranthen	206-44-0	0,072	27,549
Fluoranthen	206-44-0	0,062	13,014
Fluoranthen	206-44-0	0,047	16,587
Fluoranthen	206-44-0	0,036	7,822
Fluoranthen	206-44-0	0,027	6,028
Fluoranthen	206-44-0	0,020	-3,442
Fluoranthen	206-44-0	0,015	0,341
Fluoranthen	206-44-0	0,012	-5,379
Fluoranthen	206-44-0	Kontrolle	15,060
Fluoranthen	206-44-0	Kontrolle	0,106
Fluoranthen	206-44-0	Kontrolle	-2,947
Fluoranthen	206-44-0	Kontrolle	-5,547
Fluoranthen	206-44-0	Kontrolle	-3,249
Fluoranthen	206-44-0	Kontrolle	-3,425
Phoxim	14816-18-3	2,718	91,936
Phoxim	14816-18-3	1,294	77,355
Phoxim	14816-18-3	0,616	48,220
Phoxim	14816-18-3	0,293	24,324
Phoxim	14816-18-3	0,140	16,693
Phoxim	14816-18-3	0,067	10,116
Phoxim	14816-18-3	0,032	5,365
Phoxim	14816-18-3	0,015	3,606
Phoxim	14816-18-3	0,007	2,423
Phoxim	14816-18-3	0,003	-0,996
Phoxim	14816-18-3	0,001	-0,197

Substanz	CAS RN	Konzentration	Hemmung der
		[ $\mu\text{mol/L}$ ]	Algenreproduktion [%]
Phoxim	14816-18-3	0,0002	-1,727
Phoxim	14816-18-3	2,718	86,572
Phoxim	14816-18-3	1,294	68,009
Phoxim	14816-18-3	0,616	48,691
Phoxim	14816-18-3	0,293	25,928
Phoxim	14816-18-3	0,140	20,577
Phoxim	14816-18-3	0,067	13,392
Phoxim	14816-18-3	0,032	9,793
Phoxim	14816-18-3	0,015	7,688
Phoxim	14816-18-3	0,007	2,237
Phoxim	14816-18-3	0,003	2,299
Phoxim	14816-18-3	0,001	4,665
Phoxim	14816-18-3	0,0002	0,497
Phoxim	14816-18-3	2,718	86,844
Phoxim	14816-18-3	1,294	65,216
Phoxim	14816-18-3	0,616	44,832
Phoxim	14816-18-3	0,293	25,098
Phoxim	14816-18-3	0,140	16,848
Phoxim	14816-18-3	0,067	9,924
Phoxim	14816-18-3	0,032	10,995
Phoxim	14816-18-3	0,015	2,590
Phoxim	14816-18-3	0,007	0,769
Phoxim	14816-18-3	0,003	1,469
Phoxim	14816-18-3	0,001	1,302
Phoxim	14816-18-3	0,0002	-0,154
Phoxim	14816-18-3	Kontrolle	0,713
Phoxim	14816-18-3	Kontrolle	2,386
Phoxim	14816-18-3	Kontrolle	-1,306
Phoxim	14816-18-3	Kontrolle	1,184
Phoxim	14816-18-3	Kontrolle	-0,433
Phoxim	14816-18-3	Kontrolle	-2,545
Biphenyl	92-52-4	1,994	69,002
Biphenyl	92-52-4	1,488	35,255
Biphenyl	92-52-4	1,110	17,727
Biphenyl	92-52-4	0,829	7,444
Biphenyl	92-52-4	0,618	3,514
Biphenyl	92-52-4	0,461	-3,300
Biphenyl	92-52-4	0,344	2,789
Biphenyl	92-52-4	0,257	-3,780
Biphenyl	92-52-4	0,192	-2,199
Biphenyl	92-52-4	0,143	-4,389
Biphenyl	92-52-4	0,080	-6,787
Biphenyl	92-52-4	0,044	-8,460
Biphenyl	92-52-4	1,994	92,219
Biphenyl	92-52-4	1,488	59,131
Biphenyl	92-52-4	1,110	26,405
Biphenyl	92-52-4	0,829	13,804
Biphenyl	92-52-4	0,618	5,144
Biphenyl	92-52-4	0,461	4,301
Biphenyl	92-52-4	0,344	-0,268
Biphenyl	92-52-4	0,257	1,282

Substanz	CAS RN	Konzentration [µmol/L]	Hemmung der Algenreproduktion [%]
Biphenyl	92-52-4	0,192	2,622
Biphenyl	92-52-4	0,143	-2,513
Biphenyl	92-52-4	0,080	-4,063
Biphenyl	92-52-4	0,044	-1,480
Biphenyl	92-52-4	1,994	91,038
Biphenyl	92-52-4	1,488	52,408
Biphenyl	92-52-4	1,110	26,676
Biphenyl	92-52-4	0,829	18,951
Biphenyl	92-52-4	0,618	9,086
Biphenyl	92-52-4	0,461	5,618
Biphenyl	92-52-4	0,344	6,134
Biphenyl	92-52-4	0,257	4,234
Biphenyl	92-52-4	0,192	2,192
Biphenyl	92-52-4	0,143	1,835
Biphenyl	92-52-4	0,080	1,245
Biphenyl	92-52-4	0,044	4,566
Biphenyl	92-52-4	Kontrolle	-3,325
Biphenyl	92-52-4	Kontrolle	-4,899
Biphenyl	92-52-4	Kontrolle	-0,914
Biphenyl	92-52-4	Kontrolle	0,052
Biphenyl	92-52-4	Kontrolle	9,086
Chloralhydrat	302-17-0	2599,758	78,216
Chloralhydrat	302-17-0	2063,300	63,690
Chloralhydrat	302-17-0	1637,540	47,386
Chloralhydrat	302-17-0	1299,635	34,738
Chloralhydrat	302-17-0	1031,456	24,177
Chloralhydrat	302-17-0	818,616	2,847
Chloralhydrat	302-17-0	649,695	-2,325
Chloralhydrat	302-17-0	515,631	4,162
Chloralhydrat	302-17-0	409,231	-3,595
Chloralhydrat	302-17-0	324,787	-5,183
Chloralhydrat	302-17-0	257,767	-4,094
Chloralhydrat	302-17-0	204,577	3,391
Chloralhydrat	302-17-0	2599,758	74,460
Chloralhydrat	302-17-0	2063,300	56,409
Chloralhydrat	302-17-0	1637,540	49,699
Chloralhydrat	302-17-0	1299,635	32,479
Chloralhydrat	302-17-0	1031,456	28,255
Chloralhydrat	302-17-0	818,616	14,868
Chloralhydrat	302-17-0	649,695	5,478
Chloralhydrat	302-17-0	515,631	2,937
Chloralhydrat	302-17-0	409,231	-3,051
Chloralhydrat	302-17-0	324,787	0,760
Chloralhydrat	302-17-0	257,767	-2,007
Chloralhydrat	302-17-0	204,577	2,166
Chloralhydrat	302-17-0	Kontrolle	4,572
Chloralhydrat	302-17-0	Kontrolle	8,439
Chloralhydrat	302-17-0	Kontrolle	-4,754
Chloralhydrat	302-17-0	Kontrolle	-8,257

Substanz	CAS RN	Konzentration	Hemmung der
		[ $\mu\text{mol/L}$ ]	Algenreproduktion [%]
Chloralhydrat	302-17-0	2599,758	63,346
Chloralhydrat	302-17-0	2063,300	60,257
Chloralhydrat	302-17-0	1637,540	46,410
Chloralhydrat	302-17-0	1299,635	26,735
Chloralhydrat	302-17-0	1031,456	28,432
Chloralhydrat	302-17-0	818,616	24,122
Chloralhydrat	302-17-0	649,695	10,680
Chloralhydrat	302-17-0	515,631	1,520
Chloralhydrat	302-17-0	409,231	-2,445
Chloralhydrat	302-17-0	324,787	7,626
Chloralhydrat	302-17-0	257,767	6,477
Chloralhydrat	302-17-0	204,577	10,362
Chloralhydrat	302-17-0	Kontrolle	4,454
Chloralhydrat	302-17-0	Kontrolle	1,520
Chloralhydrat	302-17-0	Kontrolle	-5,974
Atrazin	1912-24-9	0,278	96,694
Atrazin	1912-24-9	0,198	85,161
Atrazin	1912-24-9	0,142	62,095
Atrazin	1912-24-9	0,101	60,831
Atrazin	1912-24-9	0,072	34,471
Atrazin	1912-24-9	0,052	30,565
Atrazin	1912-24-9	0,037	21,010
Atrazin	1912-24-9	0,026	16,477
Atrazin	1912-24-9	0,019	7,361
Atrazin	1912-24-9	0,013	0,010
Atrazin	1912-24-9	0,010	-0,315
Atrazin	1912-24-9	0,007	-0,716
Atrazin	1912-24-9	0,278	88,955
Atrazin	1912-24-9	0,198	85,587
Atrazin	1912-24-9	0,142	76,220
Atrazin	1912-24-9	0,101	62,897
Atrazin	1912-24-9	0,072	49,723
Atrazin	1912-24-9	0,052	26,983
Atrazin	1912-24-9	0,037	18,105
Atrazin	1912-24-9	0,026	8,100
Atrazin	1912-24-9	0,019	0,524
Atrazin	1912-24-9	0,013	-5,462
Atrazin	1912-24-9	0,010	-3,333
Atrazin	1912-24-9	0,007	-7,816
Atrazin	1912-24-9	0,278	83,533
Atrazin	1912-24-9	0,198	82,895
Atrazin	1912-24-9	0,142	72,364
Atrazin	1912-24-9	0,101	57,825
Atrazin	1912-24-9	0,072	48,071
Atrazin	1912-24-9	0,052	26,971
Atrazin	1912-24-9	0,037	22,951
Atrazin	1912-24-9	0,026	1,876
Atrazin	1912-24-9	0,019	6,284
Atrazin	1912-24-9	0,013	3,341
Atrazin	1912-24-9	0,010	3,667
Atrazin	1912-24-9	0,007	-1,956

Substanz	CAS RN	Konzentration	Hemmung der
		[ $\mu\text{mol/L}$ ]	Algenreproduktion [%]
Atrazin	1912-24-9	Kontrolle	5,846
Atrazin	1912-24-9	Kontrolle	1,801
Atrazin	1912-24-9	Kontrolle	-3,358
Atrazin	1912-24-9	Kontrolle	-1,342
Atrazin	1912-24-9	Kontrolle	0,411
Atrazin	1912-24-9	Kontrolle	-3,358
Parathion	56-38-2	24,858	72,142
Parathion	56-38-2	21,805	53,245
Parathion	56-38-2	19,127	42,078
Parathion	56-38-2	16,778	38,985
Parathion	56-38-2	12,910	20,701
Parathion	56-38-2	9,934	6,067
Parathion	56-38-2	7,644	-6,723
Parathion	56-38-2	5,882	-10,943
Parathion	56-38-2	4,526	-6,790
Parathion	56-38-2	3,482	-3,586
Parathion	56-38-2	2,680	-8,144
Parathion	56-38-2	2,062	-9,840
Parathion	56-38-2	24,858	83,780
Parathion	56-38-2	21,805	72,705
Parathion	56-38-2	19,127	57,484
Parathion	56-38-2	16,778	45,803
Parathion	56-38-2	12,910	30,802
Parathion	56-38-2	9,934	14,949
Parathion	56-38-2	7,644	4,934
Parathion	56-38-2	5,882	1,632
Parathion	56-38-2	4,526	3,139
Parathion	56-38-2	3,482	2,190
Parathion	56-38-2	2,680	2,937
Parathion	56-38-2	2,062	4,634
Parathion	56-38-2	24,858	95,106
Parathion	56-38-2	21,805	68,166
Parathion	56-38-2	19,127	54,850
Parathion	56-38-2	16,778	52,081
Parathion	56-38-2	12,910	30,550
Parathion	56-38-2	9,934	20,327
Parathion	56-38-2	7,644	15,568
Parathion	56-38-2	5,882	8,603
Parathion	56-38-2	4,526	7,176
Parathion	56-38-2	3,482	5,430
Parathion	56-38-2	2,062	5,400
Parathion	56-38-2	Kontrolle	-4,426
Parathion	56-38-2	Kontrolle	-4,456
Parathion	56-38-2	Kontrolle	-0,640
Parathion	56-38-2	Kontrolle	-0,309
Parathion	56-38-2	Kontrolle	2,808
Parathion	56-38-2	Kontrolle	7,023
Lindan	58-89-9	5,931	69,627
Lindan	58-89-9	4,984	49,326
Lindan	58-89-9	4,188	33,792

Substanz	CAS RN	Konzentration	Hemmung der
		[ $\mu\text{mol/L}$ ]	Algenreproduktion [%]
Lindan	58-89-9	3,520	27,145
Lindan	58-89-9	2,958	19,007
Lindan	58-89-9	2,486	13,991
Lindan	58-89-9	2,089	9,317
Lindan	58-89-9	1,755	4,886
Lindan	58-89-9	1,475	6,625
Lindan	58-89-9	1,239	-0,233
Lindan	58-89-9	1,042	-0,818
Lindan	58-89-9	0,875	1,835
Lindan	58-89-9	5,931	66,990
Lindan	58-89-9	4,984	53,812
Lindan	58-89-9	4,188	33,675
Lindan	58-89-9	3,520	32,013
Lindan	58-89-9	2,958	21,395
Lindan	58-89-9	2,486	11,049
Lindan	58-89-9	2,089	11,026
Lindan	58-89-9	1,755	7,827
Lindan	58-89-9	1,475	2,623
Lindan	58-89-9	1,239	4,308
Lindan	58-89-9	1,042	-2,121
Lindan	58-89-9	0,875	1,640
Lindan	58-89-9	5,931	67,746
Lindan	58-89-9	4,984	55,427
Lindan	58-89-9	4,188	49,201
Lindan	58-89-9	3,520	34,385
Lindan	58-89-9	2,958	24,952
Lindan	58-89-9	2,486	17,790
Lindan	58-89-9	2,089	10,051
Lindan	58-89-9	1,755	3,481
Lindan	58-89-9	1,475	9,536
Lindan	58-89-9	1,239	4,386
Lindan	58-89-9	1,042	4,535
Lindan	58-89-9	0,875	7,312
Lindan	58-89-9	Kontrolle	-1,200
Lindan	58-89-9	Kontrolle	0,992
Lindan	58-89-9	Kontrolle	-3,525
Lindan	58-89-9	Kontrolle	-1,590
Lindan	58-89-9	Kontrolle	5,323

## KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-DATEN DER MISCHUNG

*Mischung im EC01-Design*

<b>Ansatz</b> (vgl. Abb. 16, Kap. 3.2.2, Tab. 7, Kap. 2.4.2)	<b>Konzentration</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>Hemmung</b> (%)	<b>pH</b>
A	1056,79	92,48	6,7
A	845,43	97,60	6,7
A	676,34	42,46	6,8
A	541,07	27,91	6,8
A	432,86	17,57	6,8
A	346,29	9,82	6,8
A	277,03	4,97	6,8
A	221,62	-1,22	6,9
A	177,30	-1,79	6,9
A	141,84	1,05	6,9
A	113,47	0,06	6,9
A	1056,79	92,62	6,7
A	845,43	95,97	6,7
A	676,34	94,95	6,7
A	541,07	24,80	6,8
A	432,86	16,46	6,81
A	346,29	10,78	6,84
A	277,03	3,09	6,86
A	221,62	0,32	6,88
A	177,30	1,55	6,87
A	141,84	2,30	6,9
A	113,47	4,11	6,9
A	Kontrolle	0,01	6,9
A	Kontrolle	-2,59	7,0
A	Kontrolle	-2,00	6,9
A	Kontrolle	1,89	6,9
A	Kontrolle	1,47	7,0
A	Kontrolle	1,21	7,0
B	756,61	94,02	6,9
B	687,81	93,87	6,9
B	625,27	29,14	6,9
B	568,42	24,05	6,9
B	516,73	18,21	6,9
B	469,75	14,42	7,0
B	427,04	9,85	7,0
B	388,21	5,84	7,0
B	756,61	90,58	6,9
B	687,81	92,26	6,9
B	625,27	56,10	6,9
B	568,42	20,07	6,9
B	516,73	12,63	6,9
B	469,75	10,22	6,9
B	427,04	2,82	6,9
B	388,21	0,51	6,9

<b>Ansatz</b> (vgl. Abb. 16, Kap. 3.2.2, Tab. 7, Kap. 2.4.2)	<b>Konzentration</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>Hemmung</b> (%)	<b>pH</b>
B	756,61	91,39	6,9
B	687,81	82,90	6,9
B	625,27	19,42	6,9
B	568,42	13,00	6,9
B	516,73	7,12	6,9
B	469,75	5,34	6,9
B	427,04	-5,39	6,86
B	388,21	-6,14	6,9
B	Kontrolle	1,09	7,0
B	Kontrolle	1,15	6,8
B	Kontrolle	0,56	6,9
B	Kontrolle	1,89	7,0
B	Kontrolle	-3,47	6,9
B	Kontrolle	-1,23	6,9
C	666,05	95,02	6,69
C	584,25	95,40	6,69
C	512,50	53,86	6,72
C	449,56	30,07	6,75
C	394,35	19,25	6,76
C	345,92	10,98	6,78
C	303,44	10,04	6,80
C	266,18	10,44	6,81
C	233,49	0,30	6,81
C	865,59	93,19	6,69
C	759,29	96,24	6,73
C	666,05	97,06	6,74
C	584,25	98,09	6,75
C	512,50	96,59	6,76
C	449,56	94,37	6,76
C	394,35	97,70	6,76
C	345,92	25,03	6,78
C	303,44	20,73	6,79
C	266,18	14,67	6,80
C	233,49	6,17	6,82
C	865,59	90,05	6,72
C	759,29	93,49	6,73
C	666,05	96,02	6,74
C	584,25	94,97	6,75
C	512,50	93,06	6,73
C	449,56	24,08	6,74
C	394,35	16,14	6,74
C	345,92	18,28	6,78
C	303,44	4,57	6,78
C	266,18	8,80	6,80
C	233,49	4,93	6,80
C	Kontrolle	2,92	6,91
C	Kontrolle	-2,42	6,93
C	Kontrolle	-2,15	6,87
C	Kontrolle	2,57	6,98
C	Kontrolle	-2,91	7,10
C	Kontrolle	1,99	6,96

<b>Ansatz</b> (vgl. Abb. 16, Kap. 3.2.2, Tab. 7, Kap. 2.4.2)	<b>Konzentration</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>Hemmung</b> (%)	<b>pH</b>
D	744,35	91,42	6,62
D	708,91	91,00	6,64
D	675,15	91,89	6,64
D	643,00	92,33	6,67
D	583,22	90,73	6,70
D	555,45	93,61	6,72
D	503,81	30,77	6,78
D	479,82	47,29	6,78
D	456,97	-6,49	6,77
D	414,48	-14,02	6,77
D	358,05	-7,55	6,81
D	341,00	-11,03	6,84
D	324,76	-7,65	6,84
D	254,46	-1,76	6,86
D	230,80	-17,49	6,85
D	Kontrolle	9,65	6,85
D	Kontrolle	-5,90	6,89
D	Kontrolle	-5,52	6,91
D	Kontrolle	-4,90	6,96
D	Kontrolle	-2,25	6,92
D	Kontrolle	8,92	7,10
E	999,93	69,25	6,6
E	847,40	65,08	6,7
E	718,13	55,38	6,7
E	608,59	49,15	6,7
E	515,75	37,71	6,7
E	437,08	27,14	6,8
E	370,40	21,46	6,8
E	313,90	17,33	6,8
E	266,02	11,92	6,8
E	225,44	9,48	6,8
E	191,05	6,81	6,8
E	161,91	4,88	6,9
E	999,93	69,49	6,6
E	847,40	64,83	6,6
E	718,13	58,25	6,7
E	608,59	48,57	6,7
E	515,75	36,01	6,8
E	437,08	21,86	6,8
E	370,40	19,41	6,8
E	313,90	15,81	6,8
E	266,02	8,09	6,8
E	225,44	7,21	6,9
E	191,05	2,79	6,9
E	161,91	5,56	6,9
E	999,93	66,19	6,6
E	847,40	62,94	6,6
E	718,13	53,10	6,7
E	608,59	40,69	6,7
E	515,75	30,39	6,8
E	437,08	20,95	6,8
E	370,40	11,65	6,8

<b>Ansatz</b> (vgl. Abb. 16, Kap. 3.2.2, Tab. 7, Kap. 2.4.2)	<b>Konzentration</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>Hemmung</b> (%)	<b>pH</b>
E	313,90	9,97	6,8
E	266,02	5,22	6,8
E	225,44	4,72	6,9
E	191,05	5,90	6,9
E	161,91	4,91	6,9
E	Kontrolle	3,98	6,9
E	Kontrolle	-2,56	7,0
E	Kontrolle	-3,02	6,9
E	Kontrolle	0,28	6,9
E	Kontrolle	-1,69	7,0
E	Kontrolle	3,01	6,9
F	1048,95	88,21	6,71
F	845,93	88,74	6,71
F	682,20	89,53	6,71
F	550,16	91,60	6,75
F	443,68	42,71	6,77
F	357,81	28,06	6,79
F	288,55	17,73	6,82
F	232,70	16,66	6,82
F	187,66	14,13	6,83
F	151,34	11,97	6,82
F	122,05	17,21	6,84
F	98,43	10,54	6,85
F	Kontrolle	-0,23	6,92
F	Kontrolle	-2,86	6,98
F	Kontrolle	-2,20	7,14
F	Kontrolle	-4,06	6,87
F	Kontrolle	3,11	6,88
F	Kontrolle	6,26	6,94

## Mischung im EC50-Design

<b>Ansatz</b> (vgl. Tab. 6, Kap. 2.4.2)	<b>Datensätze</b> (Teil der 44 bzw. 111 Datenpunkte in Abb. 14, Kap. 3.2.2)	<b>Konzentration</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>Hemmung</b> (%)
A	44	441,38	95,61
A	44	315,27	42,68
A	44	225,19	11,41
A	44	160,85	5,22
A	44	114,89	-2,37
A	44	82,07	1,43
A	44	58,62	4,11
A	44	41,87	3,97
A	44	29,91	4,67
A	44	441,38	93,97
A	44	315,27	85,49
A	44	225,19	17,50
A	44	160,85	3,17
A	44	114,89	0,16
A	44	82,07	4,24
A	44	58,62	3,51
A	44	41,87	4,62
A	44	29,91	6,68
A	44	617,93	94,11
A	44	441,38	97,78
A	44	315,27	89,54
A	44	225,19	12,64
A	44	160,85	1,88
A	44	114,89	1,08
A	44	82,07	-5,20
A	44	58,62	3,57
A	44	41,87	5,69
A	44	29,91	4,76
A	44	Kontrolle	3,14
A	44	Kontrolle	-1,94
A	44	Kontrolle	-0,32
A	44	Kontrolle	-2,20
A	44	Kontrolle	-0,48
A	44	Kontrolle	1,80
C	44	393,16	92,74
C	44	357,42	91,56
C	44	324,92	97,44
C	44	295,38	98,08
C	44	268,53	97,08
C	44	244,12	99,30
C	44	221,93	95,39
C	44	201,75	16,85
C	44	393,16	91,63
C	44	357,42	96,20
C	44	324,92	98,04
C	44	295,38	97,20
C	44	268,53	95,56
C	44	244,12	96,66
C	44	221,93	84,79
C	44	201,75	3,31
C	44	Kontrolle	-3,91
C	44	Kontrolle	2,23

<b>Ansatz</b> (vgl. Tab. 6, Kap. 2.4.2)	<b>Datensätze</b> (Teil der 44 bzw. 111 Datenpunkte in Abb. 14, Kap. 3.2.2)	<b>Konzentration</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>Hemmung</b> (%)
C	44	Kontrolle	-1,37
C	44	Kontrolle	2,38
C	44	Kontrolle	0,67
D	111	500,03	40,00
D	111	427,38	28,64
D	111	365,28	21,89
D	111	312,20	20,22
D	111	266,84	20,22
D	111	228,07	20,96
D	111	194,93	10,58
D	111	166,61	2,18
D	111	142,40	-1,41
D	111	121,71	-3,92
D	111	104,03	-4,13
D	111	88,91	3,72
D	111	500,03	50,38
D	111	427,38	29,91
D	111	365,28	25,43
D	111	312,20	28,18
D	111	266,84	27,86
D	111	228,07	22,84
D	111	194,93	14,74
D	111	166,61	1,26
D	111	142,40	-2,23
D	111	121,71	-3,15
D	111	104,03	2,54
D	111	88,91	1,51
D	111	500,03	63,36
D	111	365,28	32,41
D	111	312,20	22,43
D	111	266,84	15,97
D	111	228,07	8,30
D	111	194,93	1,77
D	111	166,61	1,77
D	111	142,40	3,76
D	111	121,71	-4,13
D	111	104,03	0,03
D	111	88,91	-1,87
D	111	Kontrolle	1,97
D	111	Kontrolle	-2,28
D	111	Kontrolle	-2,54
D	111	Kontrolle	1,10
D	111	Kontrolle	-1,26
D	111	Kontrolle	3,00
E	111	304,64	9,30
E	111	284,71	11,06
E	111	266,09	12,94
E	111	248,68	12,37
E	111	232,41	-9,93
E	111	217,21	5,69
E	111	203,00	10,64
E	111	189,72	7,79
E	111	177,31	11,55
E	111	165,71	2,95
E	111	154,87	4,91

<b>Ansatz</b> (vgl. Tab. 6, Kap. 2.4.2)	<b>Datensätze</b> (Teil der 44 bzw. 111 Datenpunkte in Abb. 14, Kap. 3.2.2)	<b>Konzentration</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>Hemmung</b> (%)
E	111	144,73	13,35
E	111	135,27	9,00
E	111	126,42	0,71
E	111	118,15	5,69
E	111	110,42	-0,22
E	111	103,19	-1,49
E	111	96,44	0,71
E	111	90,13	0,17
E	111	84,24	-4,52
E	111	Kontrolle	-0,07
E	111	Kontrolle	-1,78
E	111	Kontrolle	-0,02
E	111	Kontrolle	1,78
E	111	Kontrolle	-2,17
E	111	Kontrolle	2,27
F	111	900,00	80,74
F	111	725,81	66,17
F	111	585,33	50,16
F	111	472,04	38,58
F	111	380,68	28,96
F	111	307,00	21,29
F	111	247,58	19,52
F	111	199,66	14,71
F	111	161,02	12,45
F	111	129,85	10,87
F	111	104,72	9,72
F	111	900,00	87,36
F	111	725,81	65,40
F	111	585,33	45,66
F	111	472,04	34,34
F	111	380,68	29,09
F	111	307,00	22,38
F	111	247,58	15,64
F	111	199,66	16,00
F	111	161,02	10,78
F	111	129,85	8,35
F	111	104,72	9,10
F	111	84,45	8,54
F	111	900,00	95,95
F	111	632,23	47,90
F	111	444,13	26,66
F	111	311,99	15,45
F	111	219,17	11,39
F	111	153,96	7,29
F	111	108,15	6,80
F	111	75,98	7,47
F	111	53,37	7,79
F	111	37,49	3,47
F	111	26,34	12,65
F	111	18,50	9,61
F	111	Kontrolle	4,64
F	111	Kontrolle	1,00
F	111	Kontrolle	-5,48
F	111	Kontrolle	0,50
F	111	Kontrolle	-1,01
F	111	Kontrolle	0,35

<b>Ansatz</b> (vgl. Tab. 6, Kap. 2.4.2)	<b>Datensätze</b> (Teil der 44 bzw. 111 Datenpunkte in Abb. 14, Kap. 3.2.2)	<b>Konzentration</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	<b>Hemmung</b> (%)
G	111	900,26	87,39
G	111	782,84	63,22
G	111	680,73	56,62
G	111	591,94	49,46
G	111	514,73	40,34
G	111	447,59	29,73
G	111	389,21	21,59
G	111	900,26	76,79
G	111	782,84	69,93
G	111	680,73	52,97
G	111	591,94	43,57
G	111	514,73	34,08
G	111	447,59	24,51
G	111	Kontrolle	5,01
G	111	Kontrolle	-5,80
G	111	Kontrolle	-1,11
G	111	Kontrolle	-1,22
G	111	Kontrolle	3,12
B	111	385,08	-3,91
B	111	350,07	17,65
B	111	318,25	12,79
B	111	289,32	5,30
B	111	263,01	11,48
B	111	239,10	1,11
B	111	217,37	6,52
B	111	197,61	-0,55
B	111	Kontrolle	-3,91
B	111	Kontrolle	2,23
B	111	Kontrolle	-1,37
B	111	Kontrolle	2,38
B	111	Kontrolle	0,67

*Mischung im NOEC-Design*

## TOXIZITÄTSTESTUNG UNTER PH-BEDINGUNGEN DES STANDARDTESTPROTOKOLLS

<b>Ansatz</b>	<b>Konz (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>Hemmung (%)</b>	<b>pH</b>
A	672,6	80,04	6,61
A	672,6	81,15	6,60
A	672,6	85,20	6,60
A	672,6	79,41	6,61
A	672,6	76,39	6,62
A	672,6	79,23	6,61
A	672,6	84,95	6,61
A	672,6	81,43	6,62
A	672,6	80,28	6,63
A	672,6	82,90	6,62
A	672,6	82,46	6,61
A	672,6	83,14	6,60
A	672,6	79,75	6,61
A	672,6	78,31	6,62
A	Kontrolle	2,62	6,90
A	Kontrolle	-2,17	6,90
A	Kontrolle	-2,46	6,89
A	Kontrolle	1,36	6,89
A	Kontrolle	-0,62	6,92
A	Kontrolle	1,26	6,89
B	672,6	91,14	6,68
B	672,6	91,39	6,66
B	672,6	91,87	6,67
B	672,6	93,38	6,68
B	672,6	91,18	6,67
B	672,6	93,61	6,67
B	672,6	95,06	6,69
B	672,6	92,22	6,67
B	672,6	91,90	6,66
B	672,6	92,22	6,68
B	672,6	91,89	6,67
B	672,6	93,15	6,67
B	672,6	91,81	6,68
B	672,6	92,67	6,67
B	672,6	91,74	6,67
B	672,6	94,46	6,67
B	672,6	93,22	6,67
B	672,6	93,94	6,67
B	Kontrolle	-0,94	6,89
B	Kontrolle	-3,85	6,90
B	Kontrolle	1,50	6,90
B	Kontrolle	0,90	6,89
B	Kontrolle	2,40	6,89

## TOXIZITÄTSTESTUNG BEI EINEM LEICHT INS ALKALISCHE VERSCHOBENEN PH-WERT

<b>Ansatz</b>	<b>Konz</b> ( $\mu\text{mol/L}$ )	<b>Hemmung</b> (%)	<b>pH</b>
C	672,6	63,62	7,59
C	672,6	64,16	7,55
C	672,6	64,74	7,54
C	672,6	65,90	7,54
C	672,6	58,94	7,56
C	672,6	58,91	7,54
C	672,6	62,14	7,58
C	672,6	62,70	7,58
C	672,6	59,40	7,57
C	672,6	64,06	7,54
C	672,6	69,57	7,53
C	672,6	63,87	7,53
C	672,6	63,60	7,57
C	672,6	69,13	7,53
C	672,6	63,40	7,54
C	672,6	64,05	7,55
C	672,6	65,23	7,54
C	672,6	66,48	7,54
C	Kontrolle	1,20	7,49
C	Kontrolle	-1,59	7,44
C	Kontrolle	-0,78	7,46
C	Kontrolle	-0,60	7,46
C	Kontrolle	0,03	7,47
C	Kontrolle	2,95	7,46



**Dank**



## Danksagungen

Rolf Altenburger danke ich für die exzellente Betreuung während der gesamten Promotionszeit, in der er mich insbesondere in schwierigen Phasen mit viel Zeit, Verständnis, Ermunterung und inspirierenden Diskussionen und immer neuen Blickwinkeln zu motivieren verstand. Sein außergewöhnlich menschlicher und teamorientierter Führungsstil trug und trägt maßgeblich zum positiven und produktiven Laborklima bei, an dem aber auch die 'Mitglieder' von Labor 10 Anteil haben.

Uta Kayser und Janet Krüger sei für die "superadditiv" gute Zusammenarbeit und insbesondere die Unterstützung bei der Testvorbereitung, Kultivation der Algen sowie der Assistenz bei oder der Übernahme von in Verzweiflung gescheiterter P4-Eingabeversuche gedankt.

Herrn Prof. Schüürmann danke ich für die intensive Auseinandersetzung mit meiner Arbeit, was mir rückblickend letztendlich ermöglichte, die Ergebnisse der Arbeit mit größerer Gelassenheit, Nüchternheit und Neugier zu betrachten.

Herrn Prof. Krauß von der Universität Halle-Wittenberg sei für die bereitwillige Übernahme des Erstgutachtens und die verständnisvolle Betreuung gedankt.

Herrn Prof. Ratte von der Rheinisch Westfälischen Technischen Hochschule Aachen danke ich für die freundliche Übernahme des externen Gutachtens.

Uwe Zierold, Mathias Grote und Reik Meene gilt Dank für die experimentelle Unterstützung dieser Arbeit und manch fruchtbare Diskussion.

Gedankt sei auch den Mitarbeitern aus der Sektion Analytik, insbesondere Frau Dr. Mothes, Frau Dr. Möder und Herrn Dr. Popp, für ihre Unterstützung bei der Konzentrationsanalytik einiger Substanzen.

Anja Hadler und Corvin kann ich nicht genug für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit und ihrer Toleranz meiner extremen Hoch- und Tiefphasen während der letzten Monate danken. Ohne Anjas Familien- und Lebensmanagement würde ich jetzt höchstwahrscheinlich hungernd, verdreckt und geistig dement in den Strassen Leipzigs umherirren.



# Lebenslauf



## Lebenslauf und Bildungsgang

15.08.1967	Geboren in Bremen
1980 – 1987	Gymnasium Kleine Helle, Bremen
1987	Abitur
1987 – 1988	Grundwehrdienst
1989	Ausbildung zum Industriekaufmann bei der Brauerei Beck & Co., Bremen. Abbruch nach 5 Monaten.
1990	Kriegsdienstverweigerung
1990 - 1994	Biologie-Studium an der Universität Bremen
1994 – 1995	Biologie-Studium an der University of Plymouth, England Abschlußarbeit zum Thema „ <i>Metallothionein Induktion im kleinen Sandaal Ammodytes tobianus L. als Biomarker für metallverschmutzte Gewässer.</i> “
1995	Master of Science (MSc) in Applied Fish Biology
1997 - 2000	Doktorand am UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle im Forschungsvorhaben PREDICT ( <i>Prediction and Assessment of the Aquatic Toxicity of Mixtures of Chemicals</i> ), gefördert durch die Kommission der Europäischen Gemeinschaften.
13.10.1998	Geburt meines Sohnes Corvin
21.06.1999	Tod meines Vaters Erhard Walter
2001	Dissertation zum Thema: „ <i>Kombinationswirkungen von Umweltchemikalien – Zur Analyse der milieuhängigen Mischungstoxizität von Kontaminanten mit unbekanntem Wirkungsmechanismus in umweltrelevanten Konzentrationen.</i> “



**Erklärung**



## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, Helge-Alexander Walter, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Leipzig, den 10. September 2001

---

Unterschrift Doktorand

