

LC 50-Bestimmung bei Fischen mittels stochastischer Approximation

W.KRONER

1. Einleitung

Um das Ausmaß der Toxizität eines Stoffes abschätzen zu können, kann die Wirkung auf Fische bei verschiedenen Konzentrationen des fraglichen Stoffes im Wasser geprüft werden. Ein bewährtes Maß für die Toxizität stellt die mittlere letale Konzentration, der LC 50-Wert, dar. Es ist dies jene Konzentration, bei der die Hälfte der ausgesetzten Versuchstiere letal geschädigt wird. Der häufig angewandte Versuchsplan zur Bestimmung des LC 50-Wertes besteht in der gleichzeitigen Prüfung vieler Konzentrationsniveaus. Der Ausführende des Versuches ist dabei bestrebt, daß bei möglichst vielen, mindestens aber bei drei Konzentrationen ein Teil der ausgesetzten Fische getötet wird (siehe z. B. 3, 4, 5). Aufgrund dieser Konzentrationen kann der LC 50-Wert errechnet werden. Alle anderen Konzentrationen dagegen sind für die Ermittlung des LC 50-Wertes von geringerer Bedeutung.

Eine kleinere Anzahl von Konzentrationsniveaus und damit eine Einsparung an Fischen wird dann erreicht, wenn die Größenordnung des LC 50-Wertes abgeschätzt werden kann. Diesem Zweck dient ein Vorversuch. Eine konsequente Verfolgung dieser Idee führt zu einer sequentiellen Versuchsanordnung, bei der die einzelnen Konzentrationsniveaus nacheinander getestet und die einzelnen Teilergebnisse

für eine möglichst zielführende Steuerung des Testverlaufes verwendet werden. Der geringere Aufwand an Fischen wird allerdings mit einer um ein Mehrfaches verlängerten Versuchsdauer "erkauft".

2. Planung und Auswertung eines Versuches

Die Methode der stochastischen Approximation beruht auf den Ideen von DIXON und MOOD (2) und ROBBINS und MONRO (7). Die stochastische Approximation bringt für die LC 50-Bestimmung die Neuerung, den LC 50-Wert durch nacheinander ausgeführte Teilversuche gewinnen zu können. Nach DIXON und MOOD wird die Konzentration eines Teilversuches je nach Ergebnis des vorangegangenen Teilversuches jeweils um einen konstanten Wert erhöht oder erniedrigt. ROBBINS und MONRO schlagen dagegen die Verwendung einer variablen Schrittweite vor: Wenn im i-ten Schritt n_i Fische einer Konzentration von x_i ausgesetzt waren und dabei r_i Fische zugrunde gingen, so wird die Konzentration x_{i+1} des (i+1)-ten Teilversuches folgendermaßen berechnet:

$$x_{i+1} = x_i - a_i \left(\frac{r_i}{n_i} - \frac{1}{2} \right)$$

Die a_i , $i = 1, 2, 3, \dots$ stellen eine vorgegebene Folge von Konstanten dar. Der Ausdruck in der Klammer bewirkt, daß die Konzentrationsänderung davon abhängt, wie weit der Anteil der im vorangegangenen Teilversuch zugrunde gegangenen Fische von $1/2$ entfernt ist.

Als günstige Wahl für die Folge a_i hat sich eine Folge der Form $a_i = c/i$, $i = 1, 2, 3, \dots$, mit c als Konstante erwiesen. Die Division durch i bewirkt, daß die Schrittweite mit wachsender Anzahl von Teilversuchen kleiner wird. Auch für eine optimale Wahl der Konstante c liefert

die Theorie eine Anleitung (z.B. 6,8): Man kann die Varianz der asymptotischen Normalverteilung minimal werden lassen, indem man $c = 1/\varphi$ (LC 50) wählt, wobei φ (LC 50) den Anstieg der Verteilungsfunktion im Median bedeutet.

Alle diese Überlegungen gelten allgemein für die natürlich auftretenden Verteilungsfunktionen von Todesraten in bezug auf die Konzentration. Für eine Verteilungsfunktion in der Form einer Normalverteilung mit Varianz σ^2 läßt sich die obige Schätzung der Konstanten c durch $c = \sqrt{2\pi} \sigma^2$ darstellen. Allerdings wird eine Normalverteilung von Todesraten im allgemeinen und insbesondere auch bei Fischen eher dann beobachtet, wenn die Konzentrationsskala logarithmisch transformiert wurde.

Für die Methode der stochastischen Approximation gilt ebenso wie auch für die klassische Methode: Je umfangreicher das Vorwissen ist, desto günstiger kann der Versuch angelegt und damit eine bessere Auswertung erzielt werden. Im Fall der stochastischen Approximation gilt es, die Konstante c und die Konzentration x_1 des ersten Teilversuches möglichst vorteilhaft zu wählen; letztere soll bei optimaler Wahl nahe dem LC 50-Wert liegen.

Bei geringem Vorwissen empfiehlt es sich, einen Vorversuch mit einem oder mehreren Fischen pro Konzentration durchzuführen (1). Die Konzentrationen können nacheinander geprüft werden: Man beginnt mit einer Konzentration, bei der man den LC-Wert am ehesten vermutet (aufgrund von Erfahrungen mit ähnlichen Stoffen, aufgrund vergleichbarer, bekannter LC 50-Werte,) und führt einen Teilversuch durch. Je nachdem, ob überwiegend Überleben oder

Nichtüberleben der Testfische im Teilversuch beobachtet wird, erhöht oder erniedrigt man die Konzentration in einem weiteren Teilversuch.

Auf diese Weise fährt man so lange fort, bis sich das Ergebnis des Teilversuches (überwiegend Überleben oder überwiegend Nichtüberleben) umkehrt. Falls bei einem Konzentrationsniveau ein annähernd ausgewogenes Verhältnis von überlebenden oder nicht überlebenden Fischen beobachtet wurde, wird dieses Konzentrationsniveau als Ausgangskonzentration x_1 des Hauptversuches verwendet, anderenfalls wird der Mittelwert aus den benachbarten Konzentrationen, bei denen die Umkehrung der Versuchsergebnisse beobachtet wurde, gebildet und als Ausgangskonzentration des Hauptversuches eingesetzt.

Anstatt die Konzentrationen nacheinander zu prüfen, kann der Vorversuch auch nach klassischer Methode mit gleichzeitiger Prüfung verschiedener Konzentrationen durchgeführt werden.

Im Hauptversuch ist es zweckmäßig, eine konstante Anzahl n von Fischen pro Teilversuch zu verwenden; dies vereinfacht die Auswertung der Ergebnisse. Die Zahl der Fische in einem Aquarium pro Teilversuch kann durch 1 oder eine größere Zahl festgelegt werden. Um die Dauer des Gesamtversuches in erträglichen Grenzen zu halten, wird empfohlen, mindestens drei Fische pro Aquarium zu verwenden. Für die Wahl der Konstante c sind obige Hinweise von Bedeutung; nach den in der Bundesanstalt für Wassergüte bei bisherigen Fischversuchen gewonnenen Erfahrungen erhält man einen brauchbaren Wert für die Konstante c durch

Drittellung der Anfangskonzentration x_1 :

$$c = x_1/3.$$

Nach diesen vorbereitenden Überlegungen wird im ersten Teilversuch des Hauptversuches die Ausgangskonzentration x_1 getestet. Der Anteil $\frac{r_1}{n}$ der im ersten Teilversuch zugrunde gegangenen Fische dient der Errechnung der Konzentration x_2 des nächsten Teilversuches:

$$x_2 = x_1 - \frac{x_1}{3} \left(\frac{r_1}{n} - \frac{1}{2} \right)$$

Auf gleiche Weise werden die Konzentrationen der folgenden Teilversuche aus dem Ergebnis des jeweils vorhergehenden Teilversuchs ermittelt:

$$x_{i+1} = x_i - \frac{x_i}{3} \left(\frac{r_i}{n} - \frac{1}{2} \right)$$

Die Auswertung der Ergebnisse kann auf gleiche Weise erfolgen, wie auch nach klassischer Methode erhaltene Ergebnisse ausgewertet werden. Der Grund hierfür liegt darin, daß die einzelnen Teilversuche als voneinander unabhängig betrachtet werden können. Die stochastische Approximation gestattet folgende zusätzliche Auswertungsmöglichkeit:

Der LC 50-Wert kann nach obiger Formel aus den Werten des zuletzt durchgeführten Teilversuches - gleich wie das Konzentrationsniveau für einen eventuellen weiteren Teilversuch - errechnet werden.

3. Diskussion

Die LC 50-Bestimmung mittels stochastischer Approximation erfordert im Vergleich zum klassischen Verfahren eine bedeutend längere Versuchsdauer. Da die Prüfsubstanz unverändert während der gesamten Dauer des Versuches vorrätig sein muß, ist diese Methode zur Prüfung von chemischen

Substanzen, nicht jedoch zur Prüfung von Oberflächen- und Abwässern geeignet. Eine Bestimmung nach der stochastischen Approximation ist naheliegend, wenn sich die Versuchsanordnung bevorzugt für die Prüfung von nur einem Konzentrationsniveau eignet; weiters können ein geringer Vorrat an Fischen oder an Prüfschubstanz die stochastische Approximation unabdingbar machen.

Die Durchführung eines Vorversuches ermöglicht es, die toxischen Eigenschaften der Prüfschubstanz zwanglos abzuschätzen. Lassen sich Ausgangskonzentration x_1 und Konstante c für den Hauptversuch nur mit größerem Fehler angeben, so kann die Dauer des Hauptversuches i.a. durch eine Erhöhung der Anzahl der Fische pro Aquarium (etwa auf sechs) in Grenzen gehalten werden. Der Vorteil der stochastischen Approximation, die Konzentration im Bereich um den LC 50-Wert zu prüfen, bringt den Nachteil mit sich, daß die Standardabweichung des LC 50-Wertes nur weniger genau, manchmal auch gar nicht, ermittelt werden kann.

Die stochastische Approximation ermöglicht es analog der Bestimmung des LC 50-Wertes - bei geringer Abänderung der Formel - auch andere LC-Werte (etwa LC 30, LC 70 ...) zu gewinnen, die günstigste Anwendung ist jedoch bei der LC 50-Bestimmung gegeben.

4. Beispiel

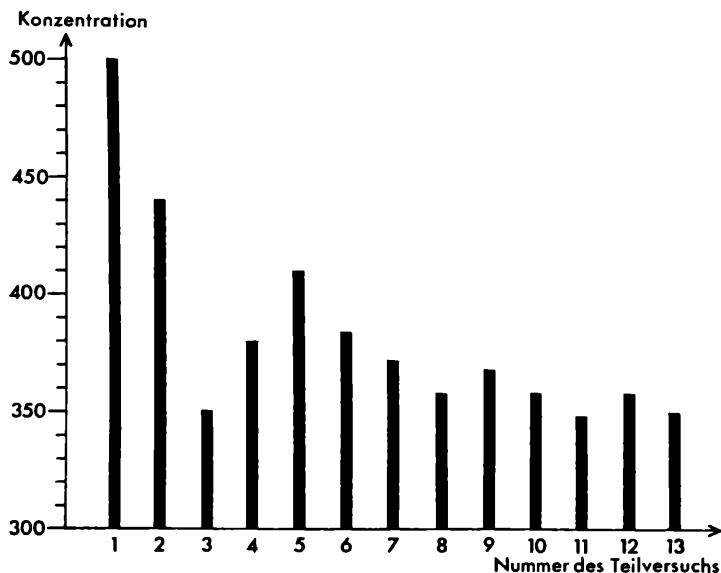
Die LC 50-Bestimmung mittels stochastischer Approximation wurde in der Bundesanstalt für Wassergüte an der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Richardson) erprobt. Als Testsubstanz wurde Nickelsulfat verwendet. Über die Toxizität dieser Substanz gegenüber Regenbogenforellen

gab es bereits Untersuchungen, weshalb auf den Vorversuch verzichtet werden konnte. Als Ausgangskonzentration für den Hauptversuch wurde der hohe Wert $x_1 = 500 \text{ mg/l}$ und für die Konstante c der Wert $c = 200$ gewählt. Die Ergebnisse der Teilversuche ($n = 1$) und - daraus resultierend - die untersuchten Konzentrationen lauten folgendermaßen:

Nummer des Teilversuches	Konzentration in mg/l	Anzahl toter Fische
1	x_1	r_1
1	500	1
2	400	1
3	350	0
4	383	0
5	408	1
6	388	1
7	372	1
8	357	0
9	370	1
10	359	1
11	349	0
12	358	1

Die Konzentration eines eventuellen 13. Teilversuches errechnet sich als $x_{13} = 350 \text{ mg/l}$. Nachstehende Skizze veranschaulicht den Verlauf des Versuches anhand der Konzentrationen.

Herrn Rudolf WEGL möchte ich für seinen besonderen Einsatz bei der Durchführung des Fischversuches danken.

Konzentrationen der Teilversuche

Eine Auswertung der Ergebnisse ist durch die Konzentration 350 mg/l eines eventuellen 13. Teilversuches gegeben. Zum Vergleich wurde der LC 50-Wert auch mittels der Maximum-Likelihood-Schätzung für die Parameter der Normalverteilung ermittelt und ergab 361 mg/l.

Auch jene Schätzwerte, welche sich bei einer geringeren Anzahl von Teilversuchen ergeben hätten, liefert folgende Aufstellung:

Der Berechnung zugrunde liegende Anzahl von Teil- versuchen	Schätzwert des LC 50-Wertes	
	nach stochastischer Approximation	nach Maximum- Likelihood- Verfahren
7	357	374
8	370	375
9	359	370
10	349	363
11	358	366
12	350	361

Dieser Versuch zeigt deutlich den hohen Zeitaufwand aufgrund stochastischer Approximation; er läßt aber auch erkennen, daß eine Schätzung des LC 50-Wertes bei Verwendung von verhältnismäßig wenigen Fischen möglich ist.

5. Zusammenfassung

Die stochastische Approximation kann eingesetzt werden, um von Chemikalien den LC 50-Wert bei Fischen zu bestimmen. Es werden Hinweise zur Planung eines derartigen Versuches gegeben, ein Beispiel wird beschrieben.

Literatur:

- (1) COCHRAN, W.G. und DAVIES, M. (1964): Stochastic approximation to the median effective dose in bioassay.- In Stochastic Models in Medicine and Biology, Madison:University of Wisconsin Press. 281-297.
- (2) DIXON, W.J. und MOOD, A.M. (1948): A method for obtaining and analyzing sensitivity data.- J.Amer. Statist.Ass., 43, 109-126.

- (3) FINNEY, D.J. (1971): Probit analysis.- Cambridge University Press.
- (4) ISO 7346 (1982): Water Quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish.
- (5) KRONER, W. (1984): Planung von Fischtoxizitätstests aufgrund der Fiducialintervalllänge.- Wasser und Abwasser, Band 28 (1984).
- (6) KUSHNER, H.J. und CLARK, D.S. (1978): Stochastic approximation methods for constrained and unconstrained systems.- Springer-Verlag.
- (7) ROBBINS, H. und MONRO, S. (1951): A stochastic approximation method.- Ann.Math.Statist., 29, 400-407.
- (8) WASAN, M.T. (1969): Stochastic approximation.- Cambridge University Press.

Anschrift des Verfassers: Ko&r Mag.Dr. Wilhelm KRONER, Bundesanstalt für Wassergüte, Schiffm&hlenstr. 120, A-1223 W i e n

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Wasser und Abwasser](#)

Jahr/Year: 1985

Band/Volume: [1984](#)

Autor(en)/Author(s): Kroner Wilhelm

Artikel/Article: [LC 50-Bestimmung bei Fischen mittels stochastischer Approximation
31-40](#)