

## Verwendung mechanistischer Effekt-Modelle in der prospektiven Umweltrisikobewertung von Pflanzenschutzmitteln

Andreas Focks ([andreas.focks@wur.nl](mailto:andreas.focks@wur.nl))

### Abstract

Toxikokinetisch-toxikodynamische (TKTD) Modelle sollen relevante Informationen für die Umweltrisikobewertung von Pestiziden liefern, insbesondere für die Extrapolation von Beobachtungen unter konstanter Exposition zu Effekten unter zeitvariabler Exposition. Ein aktuelles wissenschaftliches Gutachten der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA) analysiert, wie TKTD-Modelle die Überlebensraten unter zeitlich variablen Konzentrationen vorhersagen können. Am Beispiel von Daten zum Effekt des Fungizides Propiconazol auf das Überleben des Flohkrebse *Gammarus pulex* wird in diesem Artikel gezeigt, wie TKTD Modelle aus der Klasse der GUTS-Modelle („General Unified Threshold Models of Survival“) kalibriert und validiert werden, und letztlich zur Berechnung des Risikos von realistischen, zeitlich variablen Expositionen für das Überleben der Flohkrebse verwendet werden können.

### Schlüsselwörter

Mechanistische Effekt-Modelle, Pflanzenschutzmittel-Zulassung, TKTD, GUTS

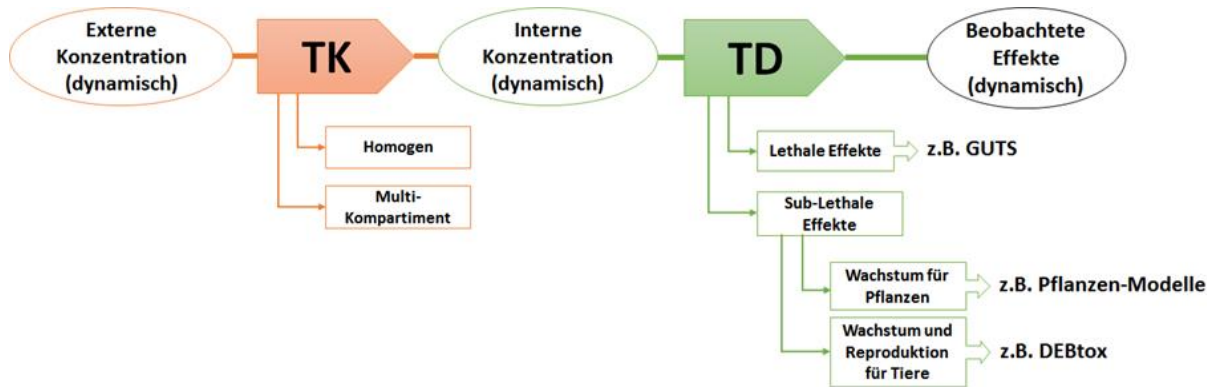
### Die Verwendung von mechanistischen Effekt-Modellen zur Vorhersage der Überlebenswahrscheinlichkeiten von Individuen unter zeitlich variablen Expositionen

In der prospektiven Umweltrisikobewertung von Pflanzenschutzmitteln werden aktive Substanzen und Pflanzenschutzmittel in einem gestuften Verfahren bewertet. Werden die Anforderungen einer Stufe nicht erfüllt, kann der aktive Inhaltsstoff oder das Produkt nicht zugelassen werden, es sei denn, auf der nächsthöheren Ebene kann die Unbedenklichkeit nachgewiesen werden. Die Stufen in diesem Bewertungsverfahren haben dabei den Anspruch, schrittweise weniger konservativ in der Risikoschätzung und näher an einem realistischen Risiko zu sein. Vielleicht am stärksten ausgearbeitet ist dieses Prinzip der gestuften Risikobewertung im aquatischen Bereich. Hier ist in der momentan gültigen Leitlinie der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA) eine Bewertung in bis zu vier Stufen vorgesehen (EFSA PPR Panel 2013). Die erste Stufe der Risikobewertung basiert dabei auf ökotoxikologischen Tests mit einer geringen Anzahl von Arten, die in Abhängigkeit von der Art und dem Wirkmechanismus der verwendeten Substanz festgelegt werden. Die in ökotoxikologischen Tests ermittelte kritische Wirkstoffkonzentration, die im Fall von Insektiziden zum Beispiel am Wasserfloh *Daphnia magna* oder an der Zuckmückenlarve *Chironomus riparius* getestet werden, wird durch einen hohen Sicherheitsfaktor (in der Regel 100) geteilt, um die so ermittelte kritische Konzentration mit erwarteten Umweltexpositionen vergleichen zu können. In der zweiten Stufe der Risikobewertung können

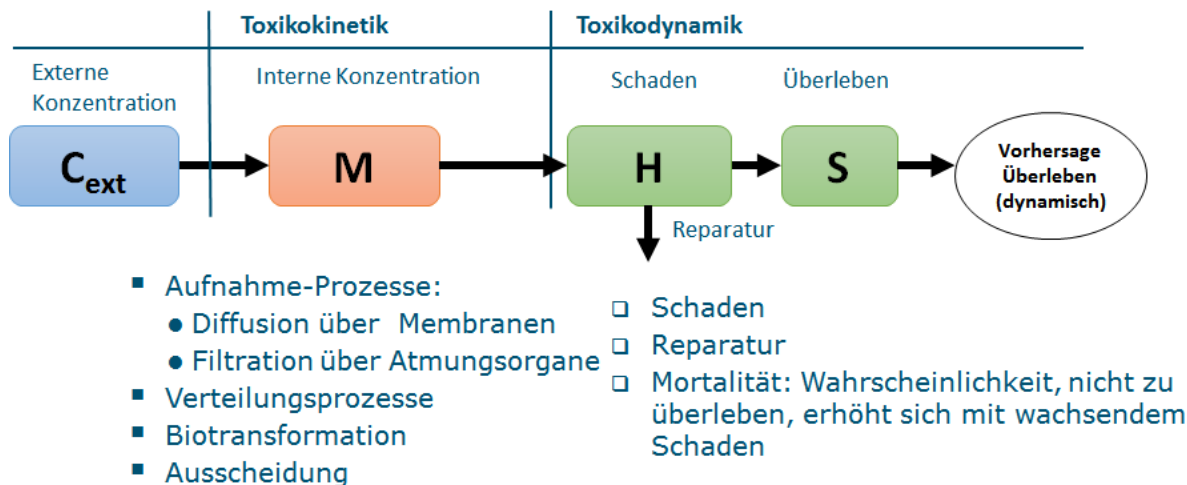
verschiedene Verfeinerungen verwendet werden, zum Beispiel können zusätzliche Arten getestet und, basierend auf einer theoretischen Sensitivitätsverteilung („species sensitivity distributions“ – siehe z.B. Posthuma et al. 2019), kritische Konzentrationen bestimmt werden. Eine andere Option ist, die ökotoxikologischen Tests unter realistischeren Expositionsbedingungen zu wiederholen. So werden in Standard-Ökotoxizitätstests normalerweise möglichst gleichbleibende Expositionskonzentrationen im Wasser angestrebt. Solch quasi-konstante Bedingungen sind zwar zur Vergleichbarkeit von Testergebnissen vorteilhaft, werden allerdings in der Umwelt kaum vorgefunden, wo statt dessen durch Sprühdraht, Oberflächenablauf, oder Drainage verursachte Wasserkonzentrationen im Laufe kurzer Zeit stark schwanken können. Derart zeitlich variable Expositionen können in Labortests nachgestellt werden, und die Auswirkungen auf Überleben und Mobilität von Wasserwirbellosen, Fischen oder Wasserpflanzen getestet werden. Solche Tests sind allerdings zeit- und kostenaufwändig und können nur eine sehr kleine Anzahl zeitlich variabler Expositionsszenarien berücksichtigen.

An dieser Stelle werden von einer aktuellen EFSA Leitlinie zur aquatischen Risikobewertung toxikokinetisch-toxikodynamische (TKTD) Modelle als Alternativen benannt, um Effekte auf das Überleben, aber auch subletale Effekte wie zum Beispiel auf Reproduktion oder Wachstum unter zeitlich variablen Expositionen zu analysieren (EFSA PPR Panel 2013). Weil es zu Verfügbarkeit und Bewertung der Qualität solcher TKTD Modelle bislang keine internationalen oder nationalen Leitlinien gab, hat eine EFSA-Arbeitsgruppe vom Januar 2017 bis Juni 2018 an einem entsprechenden wissenschaftlichen Gutachten gearbeitet.

Dieses Gutachten enthält einen Überblick über den momentanen Stand der Forschung zu mechanistischen Effektmodellen des TKTD-Typs (EFSA PPR Panel 2018). Einzelne Modelle werden näher vorgestellt und in Teilen analysiert. In weiteren Teilen des EFSA Gutachtens werden Beispiele für eine mögliche Verwendung dieser Modelle gegeben und Evaluierungskriterien für Risikobewerter in Behörden und Ämtern ausgearbeitet. Dieser Artikel stellt Grundzüge aus dem wissenschaftlichen Gutachten der EFSA vor und zeigt Prinzipien der Modellierung anhand eines Beispieldatensatzes.



**Abbildung 1:** Generelles Schema von toxikokinetisch-toxikodynamischen Modellen (adaptiert nach EFSA PPR Panel 2018).



**Abbildung 2:** Modellstruktur von TKTD Modellen aus der GUTS (General Unified Threshold Models of Survival) Kategorie (adaptiert nach EFSA PPR Panel 2018)

## Was sind TKTD Modelle?

Das allgemeine Prinzip von TKTD Modellen besteht darin, dass sie mit Hilfe von Differentialgleichungen eine externe Konzentration auf eine dynamische interne Konzentration in einem Zielorganismus übertragen (Abbildung 1). Diese Übertragung erfolgt in den einfachen Modellen in einem Zwei-Kompartiment Modell (extern-intern), in anderen Modellen werden mehrere interne Kompartimente unterschieden, gerade wenn es um die Modellierung höherer Lebewesen wie zum Beispiel von Fischen geht. Prozesse, welche an dieser Übersetzung von externen in interne Konzentrationen beteiligt sind, werden unter dem Sammelbegriff ‚Toxikokinetik‘ zusammengefasst.

Ein zweiter genereller Schritt in den TKTD Modellen verbindet dann die modellierte interne Schadstoffdynamik mit einem modellierten Schaden, der durch einen eher abstrakten und damit nicht direkt messbaren Zustand abgebildet wird. Dieser interne Schadenszustand hat dann in einem letzten Schritt der Modellierung Auswirkungen auf die beobachtbare Effektdynamik, das heißt zum Beispiel auf die zeitliche Dynamik von reduziertem Überleben, Wachstum oder Reproduktion. Generell werden TKTD-Modelle anhand beschriebener Effekte in drei Klassen unterschieden: GUTS -Modelle („General

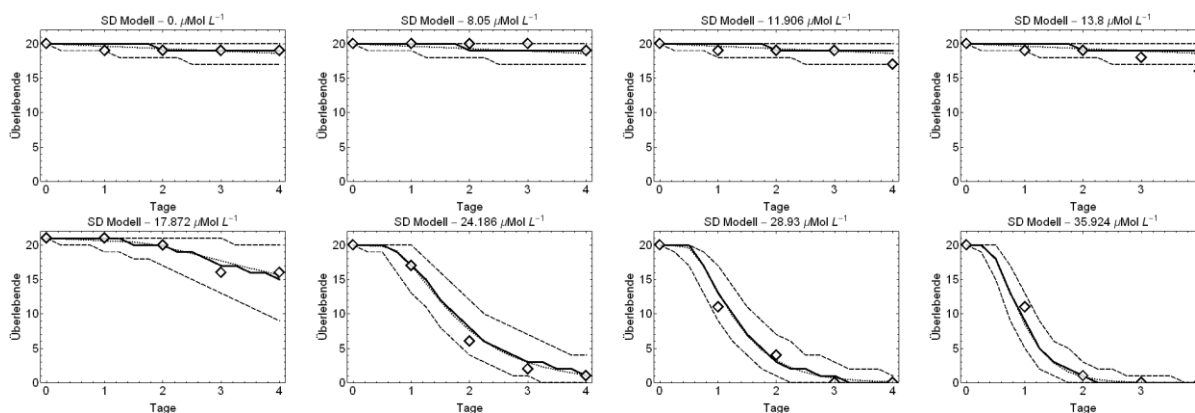
Unified Threshold Models of Survival“; z.B. Jager et al., 2011, Jager und Ashauer 2018) zur Beschreibung von Effekt auf das Überleben, DEBtox Modelle (Dynamic Energy Budget Toxizitäts-Modelle, z.B. Jager und Zimmer, 2012) welche Effekte auf Wachstum oder Reproduktion von Wasserwirbellosen oder Fischen beschreiben, und Modelle zur Beschreibung von Effekten auf Primärproduzenten wie Wasserpflanzen oder Algen (z.B. Heine et al., 2016; Schmitt et al., 2013).

## GUTS-Modelle

TKTD-Modelle aus dem GUTS-Framework beschreiben das erwartete Überleben von Individuen, die zeitlich variablen chemischen Konzentrationen ausgesetzt sind. Diese GUTS-Modelle sind strukturell einfach und bestehen aus drei bis vier Gleichungen. Das ultimative Ziel von GUTS-Modellen ist die Vorhersage des Überlebens von Individuen unter nicht getesteten Expositionsbedingungen. Innerhalb dieses Modell-Frameworks stehen als die beiden einfachsten Versionen das *Stochastic Death*-Modell (GUTS-RED-SD) und das *Individual Tolerance*-Modell (GUTS-RED-IT) zur Verfügung.

Dabei beschreiben toxikokinetische Parameter Prozesse wie zum Beispiel Diffusion über Membranen, Filtration über Atmungsorgane, aber auch Verteilungsprozesse, Biotransformation oder Ausscheidung (Abbildung 2). In der einfachsten Modellvariante werden diese Prozesse in einem Sammel-Parameter ( $k_D$  – ‚dominant rate constant‘) zusammengefasst. Toxikodynamische Prozesse modellieren einen internen Schadenszustand und dessen Auswirkung auf das Überleben, und berücksichtigen dabei Schadensereignisse im Organismus, wie je nach Wirkmechanismus z.B. die Blockierung von Enzymen bei Acetylcholinesterase-Inhibitoren wie Organophosphat-Insektiziden, oder eine Störung der Signalübertragung im Nervensystem wie bei Neonicotinoid-Insektiziden.

Hier unterscheiden sich die beiden genannten Modellversionen: während das GUTS-RED-SD Modell annimmt, dass ein interner kritischer Schwellenwert  $z$  konstant in allen Individuen ist, und die Mortalität als Zufallsprozess mit einer bestimmten Rate  $k_k$  nach Überschreiten des Schwellenwertes eintritt (‚stochastic death‘), geht das GUTS-RED-IT Modell davon aus, dass der kritische Schwellenwert eine individuelle Eigenschaft ist (‚individual tolerance‘), die in einer Gruppe von Organismen einer durch den Median aller Schwellenwerte  $\alpha$  und die Breite der Verteilung  $\beta$  zusammengefassten Verteilung folgt. Im IT Modell erfolgt der Tod unmittelbar nach Überschreitung des Schwellenwertes.



**Abbildung 3:** Kalibrierung des GUTS-RED-SD Modells am Beispiel von Daten zum Überleben des Flohkrebse *Gammarus pulex* unter Propiconazol-Exposition (Daten aus Nyman et al., 2012). Die Symbole stellen beobachtete Überlebensraten dar, durchgezogene Linien zeigen die kalibrierte Überlebensrate, und die gestrichelten Linien den 90% Konfidenzbereich. Expositionskonzentrationen werden im Titel der einzelnen Abbildungen angegeben. Kalibrierte Parameter des hier gezeigten GUTS-RED-SD Modells sind  $k_D = 2.14$  (Zeit<sup>-1</sup>),  $k_k = 0.14$  (Zeit<sup>-1</sup> L µg<sup>-1</sup>) und  $z = 17.07$  (µg/L). Details zur Kalibrierung in EFSA PPR Panel 2018.

### Validierung

Für eine Anwendung von GUTS-Modellen in der regulatorischen Risikobewertung ist es erforderlich, die Qualität von Modellvorhersagen zu überprüfen oder, mit anderen Worten, zu validieren. Diese Validierung erfolgt dadurch, dass Vorhersagen der Überlebensraten der Organismen unter Exposition von nicht für die Kalibrierung verwendeten Konzentrationsprofilen gemacht und diese Vorhersagen mit entsprechenden experimentellen Beobachtungen verglichen werden. Das EFSA Gutachten schlägt dabei verschiedene Aspekte für die Validierungsexperimente vor, u.a. das Testen von zeitlich

Diese Modellannahmen stellen eine starke Vereinfachung der tatsächlichen Prozesse dar, aber erlauben eine standardisierte Nutzung unter minimaler Verfügbarkeit von Daten. Spezies- und chemikalienspezifische Informationen werden mittels der Kalibrierung der genannten Modellparameter an Überlebensdaten ermittelt. Beobachtungen aus Standardtests zur akuten oder chronischen Toxizität sind dabei oft die einzigen Datenquellen, die zur Verfügung stehen.

### Wie werden GUTS Modelle verwendet?

#### Kalibrierung

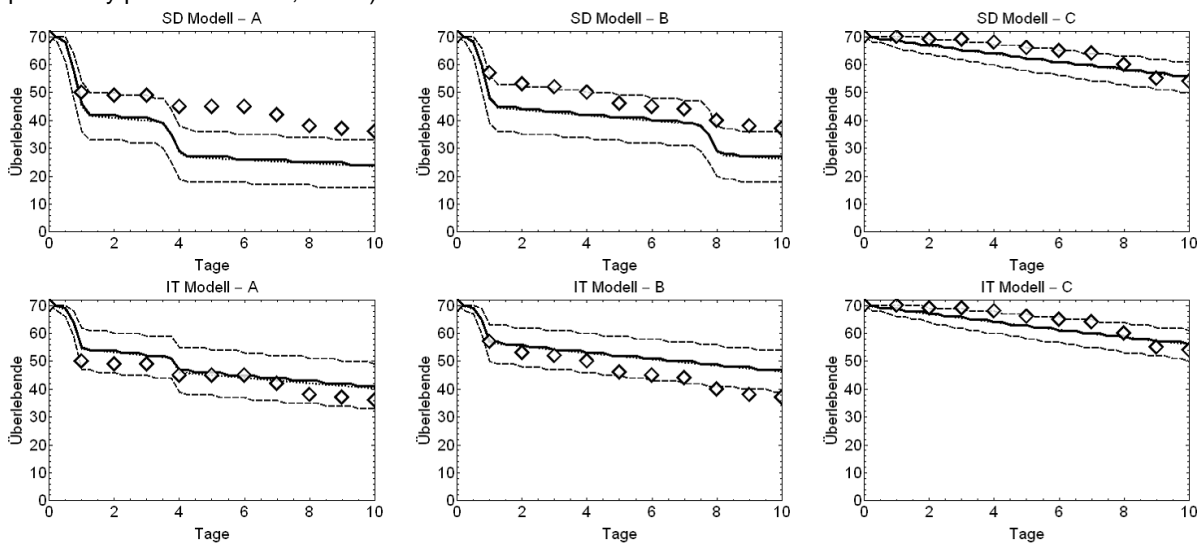
GUTS Modelle müssen für jede Kombination von Spezies und Wirkstoff kalibriert werden, d. h., die Modellparameter werden mittels eines Minimierungsalgorithmus so angepasst, dass experimentell beobachtete Überlebensraten über der Zeit möglichst genau durch die Modellgleichungen wiedergegeben werden. Modellparameter werden dabei mittels numerischer Methoden (‚likelihood ratio‘-Methode, siehe z.B. Ashauer et al., 2016) inklusive der Parameterunsicherheiten geschätzt. Auf diese Weise ermittelte optimale Parameter erlauben es in der Regel, das Überleben der Organismen an mehreren Beobachtungszeitpunkten in allen Expositionsniveaus mit nur drei Parametern zu beschreiben (Abbildung 3).

variablen Expositionskonzentrationen, die Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationsniveaus, und wie der zeitliche Abstand der Konzentrationspulse festgelegt werden sollte. Dabei sollten die Modellvorhersagen Parameterunsicherheiten und stochastische Einflüsse auf das modellierte Überleben in kleinen Gruppen von Organismen berücksichtigen (siehe auch Ashauer et al., 2016; EFSA PPR Panel 2018).

Ein Beispiel mit Literaturdaten zur Auswirkung des Fungizides Propiconazol auf den Flohkrebs *Gammarus pulex* (Nyman et al., 2012) zeigt das Überleben unter zeitlich variablen Expo-

sitionsmustern, und die entsprechenden Modellvorhersagen mit GUTS-RED-SD und GUTS-RED-IT (Abbildung 4). Dieses Beispiel wird im EFSA Gutachten ausführlicher dargestellt (EFSA PPR Panel 2018). Die Qualität der Vorhersagen wird mittels qualitativer Interpretation der Übereinstimmung zwischen Modellvorhersagen und Daten in Verbindung mit einer Anzahl von quantitativen Kriterien durchgeführt. Die drei vom EFSA Gutachten vorgeschlagenen Kriterien berücksichtigen die Unsicherheiten in Modellvorhersage und Daten („Posterior predictive check“, PPC), messen die Übereinstimmung im zeitlichen Verlauf („Normalised root mean square error“, NRMSE) und die finale Mortalitätsrate („survival probability prediction error“, SPPE).

Für das gegebene Beispiel erreichen sowohl das GUTS-ED-SD als auch das GUTS-RED-IT Modell eine gute qualitative Übereinstimmung mit den Daten. Dieses zeigt sich dadurch, dass zu den Zeitpunkten der Puls-Expositionen beide Modelle mit einer Reduzierung der Überlebensraten reagieren, auch wenn die genauen Niveaus vom SD Modell unterschätzt und vom IT Modell überschätzt werden. Die quantitativen Kriterien liegen für beide Modelle in einem akzeptablen Rahmen (siehe Beschriftung zu Abbildung 4), wobei das SD Modell leicht konservativere Vorhersagen liefert und somit bei der Auswertung von Vorhersagen eventuell stärker berücksichtigt werden könnte.



**Abbildung 4:** Validierung der GUTS Modelle am Beispiel von Daten zu Überleben des Flohkrebess *Gammarus pulex* unter zeitlich variabler Propiconazol Exposition (Daten aus Nyman et al., 2012). Die Symbole stellen beobachtete Überlebensraten dar, durchgezogenen Linien zeigen die mittlere vorhergesagte Überlebensrate, die gestrichelten Linien den 90% Konfidenzbereich. Im Expositionsszenario A wurden die Gammariden an Tag 1 und 4 Pulskonzentrationen von 28  $\mu\text{mol/L}$  ausgesetzt, im Szenario B an den Tagen 1 und 7 den gleichen Konzentrationen. In Szenario C wurden die Gammariden über 10 Tage unter einer konstanten Konzentration von 4.6  $\mu\text{mol/L}$  gehalten. Für das SD Modell liegt der PPC bei 41%, der NRMSE bei 23% und der SPPE bei 17.2% und 14.3% für die Szenarien A und B. Für das IT Modell liegt der PPC bei 86%, der NRMSE bei 11% und der SPPE bei -7.2% und -14.3% für die Szenarien A und B.

### Vorhersage von Überlebenswahrscheinlichkeiten unter zeitlich variablen Expositionen

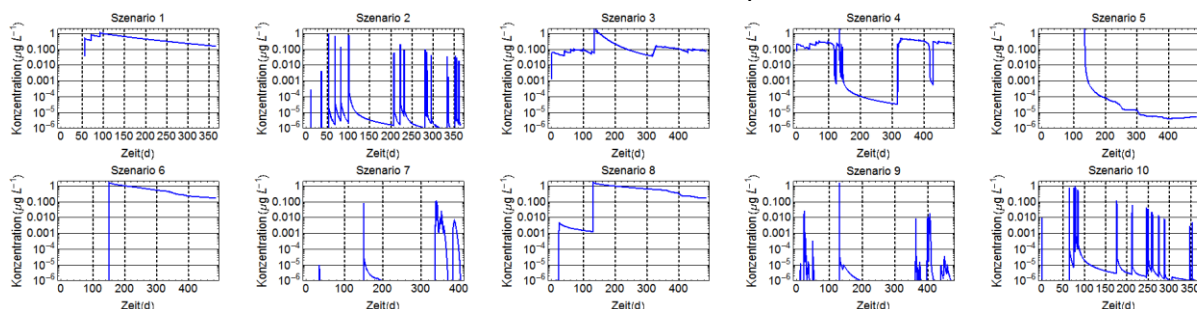
Letztendlich können kalibrierte und erfolgreich validierte GUTS Modelle zur Vorhersage von beliebig vielen zeitlich variablen Expositionen verwendet werden, wie sie zum Beispiel aus der Vorhersage von Wasserkonzentrationen mit Hilfe der FOCUS Oberflächenwasser-Software resultieren. Dabei wird jedoch häufig für ein Expositionenprofil keine signifikante Verringerung der Überlebenswahrscheinlichkeiten berechnet. Um das Risiko eines bestimmten Expositionenprofils trotzdem sinnvoll quantifizieren zu können, wird im EFSA Gutachten die Berechnung von profilspezifischen Multiplikations-Faktoren empfohlen („Lethal-profile factor 50%“, LP50). In diesem Verfahren wird ein Profil so lange mit ansteigenden Faktoren multipliziert, bis das Modell am Ende eine bestimmte Überlebenswahrscheinlichkeit vorhersagt (für weitere Einzelheiten siehe EFSA PPR Panel 2018). Die für die Risikobewertung verwendete Größe ist dabei der LP50, d.h. der Multiplikationsfaktor, der z.B. zu 50% Mortalität zum Ende eines

Konzentrationsprofils führt. Dieses Prinzip wurde von Ashauer und Kollegen als ‚Margin of safety‘ in die Literatur eingeführt (Ashauer et al., 2013).

Für Propiconazol wurden 10 vorhergesagte Expositionenprofile in Wasser erstellt (Abbildung 5). Diese Profile wurden als Eingabedaten für die Modelle GUTS-RED-SD und GUTS-RED-IT verwendet, und jeweilige LP<sub>50</sub> Werte berechnet (Tabelle 1). Der Vergleich mit den einfacheren TER-Werten zeigt eine verblüffend konsistente Berechnung des Risikos mit Hilfe der GUTS Modelle. Aus den Tabelleneinträgen ist gut ersichtlich, dass für Expositionenprofile, bei denen die Konzentration nahezu konstant bleibt (z. B. Profile 1, 3, 6 und 8 in Abbildung 5), die LP<sub>50</sub>-Werte mit den TER nahezu identisch sind. In Fällen jedoch, in denen das Expositionenprofil stark zeitvariabel ist (d.h. mit einigen Spitzen und vielen Phasen mit niedrigeren Konzentrationen dazwischen, z. B. Profile 2, 4, 7, 9 und 10 in Abbildung 5), sind LP<sub>50</sub>-Werte deutlich höher als die TER-Werte. Dies weist darauf hin, dass für einige getestete Expositionenprofile das Risiko geringer ist,

als es aus Tier 1-Berechnungen hervorgeht. Es zeigt sich auch, dass die Anwendung von GUTS-Modellierung im Gegensatz

zu den TER-Berechnungen zwischen verschiedenen Qualitäten von Expositionsprofilen unterscheiden kann



**Abbildung 5:** Konzentrationsverläufe für 10 FOCUS-Expositionsszenarien, ID-Nummern sind in den Diagrammtiteln angegeben. Weitere Details zu den FOCUS-Szenarien in Tabelle 1.

**Tabelle 1:** Analyse der Risikoschätzungen, zum einen auf Toxizitäts-Expositions-Verhältnissen beruhend ('toxicity-exposure-ratio', TER), zum anderen in Form von mittels der GUTS-RED-SD und GUTS-RED-IT berechneten  $LP_{50}$  Werte. TER Werte in dieser Tabelle basieren auf einem  $LC_{50}$  Wert für *G. pulex* von  $19.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ . G: Getreide

Szenario	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Applikation	Apfel	Apfel	G	G	G	G	G	G	G	G
FOCUS OW Szenario	R1 pond	R2 stream	D1 ditch	D1 stream	D3 ditch	D4 pond	D4 stream	D5 pond	D5 stream	R4 stream
$PEC_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	1.13	2.01	10.56	8.06	9.08	1.67	2.27	1.67	2.40	3.00
TER	17	10	2	2	2	12	8	11	8	6
$LP_{50}$ SD Modell	17	44	3	20	12	12	205	12	195	39
$LP_{50}$ IT Modell	17	49	3	24	16	12	250	12	237	39

## Fazit und Ausblick

Die Auswertung der FOCUS-Oberflächenwasserbelastungsprofile durch die GUTS-Modellierung zeigt, dass die Methode für konstante Expositionsprofile gleichbleibende Risikoabschätzungen liefert, während das Risiko für zeitvariable Profile verfeinert wird. Dieses und andere Anwendungsbeispiele unterstreichen den Nutzen, den mechanistische Effektmodelle in der regulatorischen Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln haben. Weitere Entwicklungen und Standardisierungen der DEBtox Modelle und von artspezifischen Pflanzenmodellen werden in naher Zukunft erwartet.

## Literatur

Ashauer R, Albert C, Augustine S, Cedergreen N, Charles S, Ducrot V, Focks A, Gabsi F, Gergs A, Goussen B, Jager T, Kramer NI, Nyman AM, Poulsen V, Reichenberger S, Schafer RB, Van den Brink PJ, Veltman K, Vogel S, Zimmer EI and Preuss TG, 2016. Modelling survival: exposure pattern, species sensitivity and uncertainty. *Scientific Reports*, 6, 29178.

Ashauer R, Thorbek P, Warinton JS, Wheeler JR and Maund S, 2013. A method to predict and understand fish survival under dynamic chemical stress using standard ecotoxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32, 954–965.

EFSA PPR Panel (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues), 2013. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. *EFSA Journal*, 11(7), 3290, 268 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3290>

EFSA PPR Panel (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues), 2018. Scientific Opinion on the state of the art of Toxicokinetic/Toxicodynamic (TKTD) effect models for regulatory risk assessment of pesticides for aquatic organisms. *EFSA Journal*, 16(8), 5377, 188 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5377>

Heine S, Schild F, Schmitt W, Kriebler R, Goerlitz G and Preuss TG, 2016a. A toxicokinetic and toxicodynamic modeling approach using *Myriophyllum spicatum* to predict effects caused by short-term exposure to a sulfonylurea. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35, 376–384.

Jager T, Albert C, Preuss TG and Ashauer R, 2011. General unified threshold model of survival – a toxicokinetic-toxicodynamic framework for ecotoxicology. *Environmental Science and Technology*, 45, 2529–2540.

Jager T and Zimmer E, 2012. Simplified dynamic energy budget model for analysing ecotoxicity data. *Ecological Modelling*, 225, 74–81.

Jager T and Ashauer R, 2018. Modelling survival under chemical stress. Lean, 185 pp. Available online: [https://leanpub.com/guts\\_book](https://leanpub.com/guts_book)

Nyman AM, Schirmer K and Ashauer R, 2012. Toxicokinetic-toxicodynamic modelling of survival of *Gammarus pulex* in multiple pulse exposures to propiconazole: model assumptions, calibration data requirements and predictive power. *Ecotoxicology*, 21, 1828–1840.

Posthuma L, van Gils J, Zijp MC, van de Meent D and de Zwart D, 2019. Species sensitivity distributions for use in environmental protection, assessment, and management of aquatic ecosystems for 12 386 chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(4), 905-917.

Schmitt WH, Bruns E, Dollinger M and Sowig P, 2013. Mechanistic TK/TD-model simulating the effect of growth inhibitors on Lemna populations. *Ecological Modelling*, 255, 1–10.

## Korrespondenzadresse

Dr. Andreas Focks  
Wageningen Environmental Research,  
Droevendaalsesteg 3a,  
6700 AA Wageningen, The Netherlands  
E-Mail: [andreas.focks@wur.nl](mailto:andreas.focks@wur.nl)