

# Kombinationseffekter af pesticider

Per Kudsk<sup>1</sup>, Helle Raun Andersen<sup>2</sup>, Nina Cedergreen<sup>3</sup>, Solvejg Kopp Mathiassen<sup>1</sup>, Flemming Møhlenberg<sup>4</sup>, Jens Carl Streibig<sup>3</sup> og Anne Marie Vinggaard<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Danmarks JordbrugsForskning, <sup>2</sup>Syddansk Universitet, <sup>3</sup>Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, <sup>4</sup>DHI – Institut for Vand og Miljø, <sup>5</sup>Danmarks Fødevarerforskning

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

# Kombinationseffekter af pesticider

Per Kudsk<sup>1</sup>, Helle Raun Andersen<sup>2</sup>, Nina Cedergreen<sup>3</sup>, Solvejg Kopp Mathiassen<sup>1</sup>, Flemming Møhlenberg<sup>4</sup>, Jens Carl Streibig<sup>3</sup> og Anne Marie Vinggaard<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Danmarks JordbrugsForskning, <sup>2</sup>Syddansk Universitet, <sup>3</sup>Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, <sup>4</sup>DHI – Institut for Vand og Miljø, <sup>5</sup>Danmarks Fødevarerforskning

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

# Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING	7
SUMMARY	9
SAMMENDRAG AF LITTERATURSTUDIUM	11
<i>Referencemodeller</i>	11
1 INTRODUKTION	15
2 STATISTISKE METODER TIL VURDERING AF KOMBINATIONSEFFEKTER	17
2.1 ADM ELLER MSM?	17
2.2 ET-TRINS MODELLEN	18
2.3 TO-TRINS MODELLEN	23
2.4 ANDRE METODER	24
2.5 TREKOMPONENT BLANDINGER	24
3 ANVENDTE PESTICIDERS FYSISK-KEMISKE OG BIOLOGISKE EGENSKABER	25
3.1 PESTICIDERNES FYSISK-KEMISKE EGENSKABER	25
3.2 ANVENDTE PESTICIDERS BIOLOGISKE EGENSKABER	26
4 MATERIALER OG METODER	29
4.1 TERRESTRISKE PLANTER	29
4.1.1 <i>Dyrkningsteknik</i>	29
4.1.2 <i>Akvatiske planter</i>	31
4.1.3 <i>Alger</i>	32
4.1.4 <i>Akvatiske bakterier</i>	33
4.1.5 <i>Dafnier</i>	36
4.1.6 <i>MCF7 celleproliferationsassay</i>	37
4.1.7 <i>AR reporteragenassay</i>	38
5 TOKOMPONENT BLANDINGER	41
5.1 TERRESTRISKE PLANTER	41
5.1.1 <i>Lugtløs kamille</i>	41
5.1.2 <i>Alm. fuglegræs</i>	45
5.1.3 <i>Afrunding</i>	49
5.2 AKVATISKE PLANTER	49
5.2.1 <i>Afrunding</i>	52
5.3 ALGER	52
5.3.1 <i>Afrunding</i>	55
5.4 AKVATISKE BAKTERIER	55
5.4.1 <i>Afrunding</i>	59
5.5 DAFNIER	59
5.5.1 <i>Afrunding</i>	60

5.6	HORMONFORSTYRRENDE EFFEKTER	60
5.6.1	<i>MCF7 celleproliferationsassay</i>	60
5.6.2	<i>AR reportergenassay</i>	63
5.6.3	<i>Afrunding</i>	65
<b>6</b>	<b>TREKOMPONENT BLANDINGER</b>	<b>67</b>
6.1	TERRESTRISKE PLANTER	67
6.1.1	<i>Afrunding</i>	70
6.2	AKVATISKE PLANTER	70
6.2.1	<i>Afrunding</i>	72
6.3	AKVATISKE BAKTERIER	72
6.3.1	<i>Afrunding</i>	74
6.4	HORMONFORSTYRRENDE EFFEKTER	74
6.4.1	<i>MCF7 celleproliferationsassay</i>	74
6.4.2	<i>AR reportergenassay</i>	75
6.4.3	<i>Afrunding</i>	76
<b>7</b>	<b>GENERELLE KONKLUSIONER</b>	<b>79</b>
7.1	TOKOMPONENT BLANDINGER	79
7.1.1	<i>Pesticider med samme virkningsmekanisme</i>	79
7.1.2	<i>Pesticider med samme virkemåde og forskellige virkningsmekanismer</i>	81
7.1.3	<i>Pesticider med forskellige virkemåder</i>	82
7.2	TREKOMPONENT BLANDINGER	84
<b>8</b>	<b>PERSPEKTIVERING</b>	<b>87</b>
8.1	HUMAN- VERSUS ØKOTOKSIKOLOGI	87
8.2	ADM VERSUS MSM	89
8.3	KOMBINATIONSEFFEKTER AF TOKOMPONENT OG TREKOMPONENT BLANDINGER	90
8.4	SAMMENLIGNING AF TESTSYSTEMER	92
<b>9</b>	<b>REFERENCER</b>	<b>95</b>

# Forord

Projektet "Kombinationseffekter af pesticider" er finansieret af Miljøstyrelsens Bekæmpelsesmiddelforskningsprogram. Projektet er udført ved Danmarks JordbrugsForskning (Afd. for Plantebeskyttelse og Skadedyr), Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole (Institut for Jordbrugsvidenskab), DHI, Danmarks Fødevareforskning (Institut for Toksikologi) og Syddansk Universitet (Institut for Miljømedicin).

Projektet har været fulgt af en styregruppe med følgende sammensætning:

Jørn Kirkegaard, Miljøstyrelsen  
Claus Hansen, Miljøstyrelsen  
Ole Kusk, Danmarks Tekniske Universitet  
Peter Sørensen, Danmarks Miljøundersøgelser  
Karl Henrik Vestergaard, Syngenta Crop Protection A/S  
Aage Vølund, NovoNordisk

Vi vil gerne takke styregruppens medlemmer for deres engagement og konstruktive input igennem hele projektperioden

Per Kudsk, Helle Raun Andersen, Nina Cedergreen, Flemming Møhlenberg, Solvejg Kopp Mathiassen, Jens Streibig, Anne Marie Vinggaard





# Sammenfatning

I dette projekt har vi undersøgt kombinationseffekter af pesticider forskellige testsystemer med det formål at klarlægge, 1) om det med udgangspunkt i pesticidernes virkemåde var muligt at prediktere om blandingerne vil virke additivt, antagonistisk eller synergistisk med særlig fokus på forekomsten af synergi, og 2) hvorvidt det var muligt at generalisere vedrørende kombinationseffekter på tværs af de anvendte testsystemer.

I tidligere undersøgelser af kombinationseffekter af pesticider og andre miljøfremmede stoffer har der været anvendt to forskellige statistiske modeller henholdsvis Additive Dose Model (ADM) og Multiplicative Survival Model (MSM). Sammenligninger af de to modeller har vist, at ADM som regel predikterer den største effekt af blandinger, dvs. modellen er den mest konservative, og derfor har det været foreslået at anvende denne model i risikovurderingssammenhænge. I dette projekt valgte vi derfor kun at anvende ADM, men til gengæld blev modellen videreudviklet, således at det var muligt at teste for signifikante afvigelser fra additivitet.

I projektets første fase er undersøgt i alt 101 kombinationer af tokomponent blandinger og testsystemer. I disse blandinger indgik 22 forskellige pesticider. Tre forskellige typer af blandinger er undersøgt. En gruppe af blandinger bestod af pesticider med samme virkningsmekanisme ("site of action"), en anden gruppe bestod af pesticider med samme forskellig virkningsmekanisme men samme virkemåde ("mode of action"), mens den tredje gruppe bestod af pesticider med forskellige virkemåder. I projektet er anvendt 7 forskellige standardiserede testsystemer. Af disse 7 testsystemer anvendes de 5 til at vurdere pesticiders økotoksikologiske effekter: terrestriske planter (*Tripleurospermum inodorum* og *Stellaria media*), akvatiske planter (*Lemna minor*), alger (*Pseudokirchneriella subcapitata*), akvatiske bakterier (Microtox metoden) og dafnier, mens de 2 øvrige testsystemer er udviklet med henblik på at vurdere pesticiders hormonforstyrrende effekter (østrogene og antiandrogene effekter). I de to sidstnævnte testsystemer er undersøgt pesticider, som tidligere er vist at have hormonforstyrrende effekter, men da der her er tale om utilsigtede effekter, er der tale om andre virkningsmekanismer end i de økotoksikologiske testsystemer. I projektets anden fase er undersøgt 20 forskellige kombinationer af trekomponent blandinger og test systemer. Disse blandinger blev sammensat med udgangspunkt i resultaterne med tokomponent blandingerne, således at der blev undersøgt blandinger, hvor de 3 respektive tokomponent blandinger virkede additivt, og hvor en eller flere af tokomponent blandingerne udviste antagonisme eller synergisme. Trekomponent blandingerne blev ikke undersøgt på alger og dafnier.

Tokomponent blandinger af pesticider med samme virkningsmekanisme udviste overvejende additivitet, mens blandinger med samme virkemåde men forskellige virkningsmekanismer virkede enten additivt eller antagonistisk. Med blandinger af pesticider med forskellige virkemåder blev der fundet mere varierende respons, og i 8 tilfælde blev der observeret synergi. Fælles for 6 af disse 8 blandinger var, at prochloraz var den ene af de to pesticider. Prochloraz er i nærværende projekt kun undersøgt på

bakterier og dafnier, og det er således ikke muligt at afgøre, om synergien var knyttet til disse testsystemer, til pesticidets virkemåde eller var en funktion af begge forhold. I andre undersøgelser med alger og akvatiske planter er der ikke observeret synergi med blandinger af prochloraz og andre pesticider, hvilket indikerer, at prochloraz kun virker som synergist i nogle organismer. På trods af, at der er undersøgt et meget stort antal blandinger, er det vanskeligt at drage generelle konklusioner vedrørende sammenhængen imellem pesticiders virkningsmekanisme/virkemåde og kombinationseffekter udover, at blandinger af pesticider med samme virkningsmekanisme med stor sandsynlighed vil udvise et additivt respons. Synergi blev kun observeret med 8 af de 101 kombinationer af tokomponent blandinger og testsystemer, mens antagonisme blev fundet med 14 af de 101 kombinationer. Signifikante afvigelser fra additivitet blev således kun observeret i forholdsvis få tilfælde.

Med trekomponent blandinger blev der ikke fundet nogen entydigt sammenhæng mellem de respektive tokomponent blandingers respons og trekomponent blandingsens respons med undtagelse af Microtox testen, hvor forekomsten af synergi i en eller flere af tokomponent blandingerne i 5 af 6 tilfælde også resulterede i, at trekomponent blandingen udviste synergi. Modsat blev der ikke observeret synergi med en eneste af de 11 trekomponent blandinger, hvor tokomponent blandingerne udviste additivitet eller antagonisme.

En sammenligning af resultaterne med de forskellige testsystemer viste en meget stor overensstemmelse imellem terrestriske og akvatiske planter, idet der med henholdsvis 11 og 13 af de i alt 17 tokomponent blandinger, som blev undersøgt i begge testsystemer, er fundet identiske respons imellem de to terrestriske plantearter og *Lemna minor*. Kombinationseffekter observeret i det ene testsystem synes altså i vid ustrækning at kunne ekstrapoleres til det andet testsystem, hvilket er af aktuel interesse, idet det forventes, at der i den nærmeste fremtid vil blive stillet krav om dokumentation af effekten af pesticider på terrestriske non-target planter. I forhold til terrestriske versus akvatiske planter var overensstemmelsen imellem resultaterne med alger og henholdsvis akvatiske og terrestriske planter dårligere. Der blev ligeledes fundet god overensstemmelse imellem Microtox metoden og dafnier, idet 7 af de 8 tokomponent blandinger, som blev undersøgt i begge systemer, udviste samme respons.

# Summary

In the present study we examined the joint action of pesticide mixtures using different test systems to determine 1) if it was possible to predict the joint action of pesticide mixtures based on a priori knowledge of the sites and modes of action of the components of a mixture and 2) if it was possible to generalise concerning the joint action of pesticides across test systems.

In previous studies of the joint action of xenobiotics two different reference models have been applied, the Additive Dose Model (ADM) and the Multiplicative Survival Model (MSM). Comparisons of the two reference models have revealed that in most cases ADM predicts the largest effects of mixtures, and it has been suggested to apply this model in risk assessment studies. Hence, in the present study we only adopted ADM, however the model was improved to allow for statistical tests of the hypothesis of additivity.

In the first phase of the project we examined 104 different combinations of binary pesticide mixtures and test systems. In total 22 different pesticides were included in the study. One group of mixtures consisted of pesticides with similar sites of actions, a second group consisted of mixtures of pesticides with different sites of action but similar modes of action while a third group consisted of mixtures of pesticides with different modes of actions. In the study seven different standardised test systems were included of which five are routinely used to assess ecotoxicological effects: terrestrial plants (*Tripleurospermum inodorum* and *Stellaria media*), aquatic plants (*Lemna minor*), algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*), aquatic bacteria (*Microtox metoden*) and daphnia. The other two test systems were developed to assess the estrogenic and antiandrogenic effect of pesticides and the pesticides we examined using these test systems had previously been found to mimic the effects of endogenous estrogens. In the second phase of the project we examined 20 different combinations of ternary pesticide mixtures and test systems. The compositions of the ternary mixtures were based on the results with the binary mixtures to obtain mixtures where all three binary mixtures followed ADM and where one or more of the binary mixtures deviated from ADM. Ternary mixtures were not studied on algae and daphnia.

Binary mixtures of pesticides with similar sites of action generally followed ADM, while mixtures of pesticides with different sites of action but similar modes of action either followed ADM or performed antagonistically. In contrast, the responses with binary mixtures with different modes of action were more erratic, and in eight cases synergy was observed. In six of the eight cases prochloraz was one of the pesticides of the mixture. Prochloraz was only tested on aquatic bacteria and daphnia, hence it was not possible to determine whether synergy was linked to the test system, the site of the action of prochloraz, or both. In other studies on aquatic plants and algae, binary mixtures containing prochloraz did not deviate from ADM, indicating that prochloraz only respond synergistically in some test organisms. Despite the very large number of mixtures included in the present study, it was not possible to draw general conclusions regarding the

relationship between the sites and modes of action of the pesticides and their response in joint action studies, except that mixtures of pesticides with similar sites of action tended to perform additively. Overall, additivity was by far the most likely response. Synergy was only observed with eight of 101 combinations of mixtures and test systems, while antagonism was found with 14 of the 101 combinations.

No relationship could be established between the responses of ternary mixtures and the responses of the respective binary mixtures with the exception of the Microtox test system where synergy with one of the three ternary mixtures in five out of six cases resulted in a synergistic response of the ternary mixture. In contrast synergy was not observed in any of the 11 ternary mixtures, if the response of binary mixtures were additive or antagonistic.

Comparing the responses of the different test systems revealed very similar responses on terrestrial and aquatic plants with 11 and 13 of the 17 mixtures responding identically on each of the terrestrial plant species and *Lemna minor*, respectively. Thus, deviations from ADM found on *Lemna minor* were also likely to be found on terrestrial plants suggesting that available data on the former can be extrapolated to the latter in future cases where joint action data on terrestrial non-target plants is required for pesticide registration. The correlations between algae and terrestrial and algae and aquatic plants, respectively were less significant than between terrestrial and aquatic plants. A good correlation was also observed between the responses observed using the Microtox test and daphnia with seven out of eight binary mixtures responding similarly.

# Sammendrag af litteraturstudium

Det er veldokumenteret, at ved samtidig eksponering af mennesker, dyr eller planter for to eller flere kemiske stoffer kan kemiske stoffer påvirke hinandens effekt. At undersøge og beskrive kombinationseffekter af kemiske stoffer har derfor været emnet for mange studier inden for bl.a. farmakologien og toksikologien, hvor samtidig eksponering til flere stoffer er et almindeligt forekommende fænomen. Kombinationseffekter af pesticider er blevet studeret både med henblik på at beskrive de ønskede effekter af pesticiderne på ukrudt, patogener svampe og skadedyr samt de uønskede øko- og humantoksikologiske effekter.

På trods af den store interesse for at undersøge kombinationseffekter er der ingen konsensus om hverken terminologien eller referencemodel. Mens den manglende konsensus om terminologien blot resulterer i en vis forvirring, når resultater fra forskellige undersøgelser sammenholdes, så er den manglende konsensus om valg af referencemodel en væsentlig hindring for at kunne sammenstille resultater fra forskellige studier, idet forskellige referencemodeller ofte betyder, at der også er anvendt forskellige forsøgsdesign.

I forbindelse med nærværende projekt er der gennemført et litteraturstudium, som havde til formål 1) at præsentere og diskutere de mest anvendte referencemodeller bl.a. med henblik på at fastlægge hvilke(n) model, der skulle anvendes i projektet, samt 2) at sammenstille den tilgængelige litteratur vedrørende kombinationseffekter af pesticider. Litteraturstudiet er – som projektet – begrænset til økotoksikologiske studier på akvatiske og terrestriske non-target organismer samt humantoksikologiske studier med kemiske stoffer med østrogene og antiandrogene effekter. For yderligere information om de toksikologiske effekter af pesticidblandinger henvises til et litteraturstudium udarbejdet ved Danmarks Fødevareforskning i 2003.

## Referencemodeller

Forskellige referencemodeller har været anvendt i litteraturen. Modellerne er grundlæggende baseret på en antagelse om, at enten kan kemiske stoffer erstatte hinanden med udgangspunkt i deres relative styrke analogt til vekslings af valutaer, eller også virker de kemiske stoffer uafhængigt af hinanden. Den førstnævnte gruppe af modeller betegnes "Concentration Addition" eller "Additive Dose Model (ADM)". Den sidstnævnte gruppe af modeller betegnes "Independent Action", "Effect Multiplication" eller "Multiplikative Survival Model (MSM)". En tredje model er "Effect Summation", men denne model har næsten ingen anvendelse haft i biologiske studier.

MSM blev udviklet til kvalitative responsvariable som f.eks. død/levende, dvs. minimum- og maksimumværdierne vil altid være 0 og 1 eller 0 og 100%, hvis resultaterne udtrykkes procent effekt i forhold til kontrollen. For at MSM kan anvendes på kvantitative data, er det nødvendigt at estimere det maksimale respons på grundlag af de eksperimentelle data. En vigtig men ofte overset forudsætning for at kunne anvende MSM er, at

doseringskurverne for de enkelte kemiske stoffer følger "Effect Multiplication" reglerne, hvilket er tilfældet for eksponentielle doseringskurver men ikke for de ofte anvendte log-logistiske doseringskurver. I modsætning til MSM så er ADM uafhængig af doseringskurvernes form, og følgelig vurderes ADM af mange som værende en konceptuel bedre referencemodel. Der er imidlertid kun konsensus om at anvende ADM for blandinger af kemiske stoffer med samme virkningsmekanisme, mens MSM har været den foretrukne model for blandinger af kemiske stoffer med forskellige virkningsmekanismer. Hvad der forstås ved samme virkningsmekanisme, er der imidlertid ikke enighed om. Er det tilstrækkeligt, at f.eks. to pesticider påvirker den samme fysiologiske proces, eller skal effekten være identisk på molekylært eller biokemisk niveau?

Litteraturstudiet viste, at antallet af publikationer omhandlende kombinationseffekter af kemiske stoffer, hvor minimum et af stofferne er et pesticid, var forholdsvis begrænset. Det blev derfor besluttet også at inddrage studier med andre organiske forbindelser end pesticider, idet de teoretiske overvejelser, der har ligget til grund for f.eks. valg af forsøgsdesign og referencemodel er identiske med de overvejelser, der er relevante i forbindelse med kombinationsforsøg med pesticider. Et af formålene med litteraturstudiet var at belyse anvendelse af ADM og MSM i kombinationsforsøg, og derfor er der kun medtaget studier, hvor valg af referencemodel er entydigt defineret.

#### Økotoxikologiske undersøgelser

Økotoxikologiske undersøgelser med kombinationer af organiske forbindelser er karakteriseret ved, at de har inkluderet et meget stort antal stoffer, men som regel er effekten af blandinger kun undersøgt ved et enkelt effektniveau, typisk  $EC_{50}$ . Med hensyn til de anvendte statistiske metoder grupperer undersøgelserne sig i to grupper. Enten er der anvendt Toxic Unit (TU) eller Additive Index (AI), som er en reparametrisering af TU. Begge koncepter er simplificerede versioner af ADM, hvor det ikke er nødvendigt at kende doseringskurverne for de enkelte stoffer men blot sammenhængen mellem dosering og effekt ved et enkelt effektniveau. Additivitet er karakteriseret ved at summen af TU'erne i en blanding ved et givet effektniveau er 1. TU blev oprindeligt udviklet for blandinger, hvor stofferne i en blanding undersøgtes ved ækvitoksiske doseringer, dvs. doseringer der resulterer i samme effekt. Senere er TU dog også anvendt for blandinger bestående af ikke-ækvitoksiske doseringer. TU konceptet er senere udvidet med en såkaldt "similarity parameter", som angiver afvigelser fra additivitet.

Det andet koncept, der er anvendt, er Könnemanns Mixture Toxicity Index (MTI). En MTI værdi på 1 indikerer additivitet, som defineret med ADM, mens en værdi på 0 indikerer "no addition", som er et specialtilfælde af MSM, hvor det individ i en population, som er mest følsom over for ét stof også er mest følsom over for alle de øvrige stoffer i blandingen. I de fleste tilfælde, hvor MSM er anvendt, har man valgt at antage, at der ingen korrelation er mellem individernes følsomhed over for de enkelte stoffer, og er det tilfældet vil MTI antage en værdi imellem 0 og 1. Könnemann definerer dette som partiel additivitet, mens antagonisme og synergisme optræder, når MTI er henholdsvis lavere end 0 eller højere end 1.

Som oftest kendes organiske stoffers virkningsmekanisme på non-target organismer ikke, men typisk opdeles stofferne i fire grupper: "inert compounds", "less inert compounds", "reactive compounds" og

”specifically acting chemicals”. På trods af denne opdeling er det vanskeligt, med baggrund i de gennemførte undersøgelser, at drage nogen konklusioner vedrørende sammenhængen mellem blandingers respons og de enkelte komponenters virkemåde.

Sammenfattende kan det konkluderes, at blandinger af stoffer med formodet samme virkningsmekanisme i de fleste tilfælde fulgte ADM, mens effekten af blandinger af stoffer med formodede forskellige virkningsmekanismer som oftest har været mindre-end-additiv, dvs.  $TU < 1$  eller  $0 < MTI < 1$ . Disse blandinger har altså i teorien kunnet være overensstemmelse med MSM, men dette er i de fleste undersøgelser ikke forsøgt verificeret. Synergi, dvs.  $TU$  og  $MTI$  værdier højere end 1, er kun observeret i meget få tilfælde. I flere af undersøgelserne har forfatterne da også konkluderet, at ADM synes at kunne anvendes som en ”worst-case” referencemodel.

På trods af det forholdsvis store omfang af kombinationsforsøg med organiske forbindelser, er undersøgelserne behæftet med en række usikkerheder. I hovedparten af forsøgene kendes sammenhængen mellem dosering og effekt ikke men blot  $EC_{50}$  værdierne. Ækvitoksiske blandinger af f.eks. en blanding bestående af 10 stoffer er fremstillet ved tilsætte 1/10 af  $EC_{50}$  doseringen af hvert stof. Kun hvis de 10 stoffer har identiske doseringskurver, som kun varierer i deres placering langs doseringsaksen, vil der være tale om ækvitoksiske doseringer. Er doseringskurvernes form forskellige, vil der ikke være tale om ækvitoksiske blandinger. En anden usikkerhedsfaktor i flere af undersøgelserne er, at aktiviteten af mange af stofferne ikke er bestemt eksperimentelt men derimod vha. Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR), hvor aktiviteten predikteres med udgangspunkt i den kendte aktivitet af stoffer med lignende kemisk struktur.

Antallet af publikationer, der beskriver økotoksikologisk relaterede undersøgelser med pesticidkombinationer, er meget begrænset sammenlignet med antallet af studier, der har undersøgt de agronomiske perspektiver ved anvendelse af pesticidblandinger.

Forsøg med binære blandinger af pesticider har vist, at disse blandinger alt overvejende har fulgt ADM. Afvigelser fra ADM har været i form af mindre-end-additive effekter, mens synergi i form af mere-end-additive effekter kun er observeret i meget få tilfælde. En sammenstilling af resultater fra en række forskellige undersøgelser med binære blandinger af pesticider udført med algen *Scenedesmus vacuolatus* som testorganisme viste, at forholdet mellem de predikterede og observerede  $EC_{50}$  værdier var tæt på 1, når ADM var anvendt som referencemodel, mens forholdet var signifikant højere end 1, når MSM var anvendt som referencemodel. Altså undervurderes effekten af blandingerne med MSM.

Indenfor de senest 3-4 år er der udført en række meget detaljerede og veltillæggende undersøgelser med multikomponent blandinger af pesticider af to forskergrupper ved universiteterne i henholdsvis Bremen og Leipzig. Formålet med disse undersøgelser har været at klarlægge, som ofte postuleret, om blandinger af pesticider med samme virkemåde følger ADM, mens pesticider med forskellige virkemåder følger MSM. Forsøg med multikomponentblandinger af henholdsvis fenolderivater, *s*-triaziner, chloracetanilider, sulfonylureaer og phenylureaer viste, at ADM beskrev effekterne af ækvitoksiske blandinger meget præcist, mens MSM som regel undervurderede effekten af disse blandinger af pesticider med samme

virkningsmekanisme. Modsat fandt man, at effekterne af blandinger af stoffer med forskellige virkningsmekanismer, hvor typisk kun et mindre antal af komponenterne var pesticider, blev beskrevet mere præcist med MSM, mens ADM overvurderede effekter af disse blandinger.

Sideløbende med de eksperimentelle undersøgelser har de to forskergrupper gennem simuleringer undersøgt under hvilke forhold, ADM og MSM predikerer forskellige effekter, samt hvilke forhold, der påvirker de to referencemodellers forudsigelser. Dette arbejde viste, at antallet af komponenter i blandingerne, doseringskurvernes hældning, forholdet mellem de enkelte komponenter i blandingen samt effektniveauet er parametre, som bestemmer forskellen mellem de to modellers forudsigelser. De eneste tilfælde hvor MSM prædikerede enten den samme effekt eller en højere effekt end ADM for blandinger af pesticider, var i de relativt få tilfælde, hvor doseringskurverne var meget flade.

#### Humantoksikologiske undersøgelser

I modsætning til det økotoksikologiske område er MSM konceptet meget udbredt inden for det humantoksikologiske område. Modsat ADM så antager MSM i den form, som den almindeligvis anvendes, at blandes to kemiske stoffer, som hver især ingen effekt har, så vil blandingen ligeledes ingen effekt have. Denne egenskab ved MSM har medført, at der i de senere år er gennemført studier, som har haft til formål at undersøge om dette er en rimelig antagelse. Konklusionen har været, at det er det for stoffer med forskellige virkningsmekanismer, dvs. at risikoen ved en eksponering for sådanne blandinger er lig risikoen ved eksponering for det mest toksiske af stofferne i blandingerne. Derimod vurderes ADM at være den korrekte referencemodel for stoffer med samme virkningsmekanisme.

I litteraturstudiet er den foreliggende litteratur vedrørende pesticiders og andre kemiske stoffers østrogener og antiandrogene effekter præsenteret. Denne gren af humantoksikologien er et eksempel på et område, hvor man antager, at stofferne virker ens, dvs. ADM vurderes at være den korrekte referencemodel. Konklusionerne i litteraturen er da også entydigt, at kombinationseffekterne af pesticider og andre kemiske stoffer kan beskrives meget præcist med ADM. Afvigelse fra ADM er observeret i et enkelt tilfælde, men blev tilskrevet andre toksiske effekter af nogle af de undersøgte stoffer.



# 1 Introduktion

Pesticider anvendes ofte i blanding, og non-target organismer i terrestriske og akvatiske miljøer vil derfor ofte eksponeres til flere pesticider samtidigt. Mennesker og dyr vil ligeledes ofte eksponeres til flere pesticider ad gangen via pesticidrester i fødevarer, foder og drikkevand. Mennesker, som i deres daglige arbejde er beskæftiget med udbringning af pesticider eller arbejder med planter o.l., som er behandlet med pesticider, er udsat for en særlig risiko for eksponering til pesticider og pesticidblandinger..

Det er velkendt, at samtidig eksponering til to eller flere pesticider kan ændre menneskers, dyrs og planters kvantitative og kvalitative respons i forhold deres respons til pesticiderne enkeltvis (NRC, 1980). Analyse af kombinationseffekter af pesticider og andre miljøfremmede stoffer har derfor været emnet for mange øko- og humantoksikologiske studier i de senere år. Formålet med disse studier har bl.a. været at undersøge mulighederne for at indarbejde viden om kombinationseffekter i de risikovurderinger, der foretages i forbindelse med registrering af pesticider (Altenburger et al., 1993; Altenburger et al., 2003; Faust et al., 2003).

I den foreliggende litteratur om kombinationseffekter af pesticider og andre miljøfremmede stoffer er der hverken konsensus om terminologien eller referencemodeller, og det er på trods af, at der er gjort et forsøg på at nå til enighed om disse centrale punkter (Greco et al., 1992). Forudsætningen for at kunne vurdere kombinationseffekter er, at man har en hypotese om, hvad den forventede effekt af en blanding er. Er effekten som forventet, kan den beskrives entydigt med referencemodellen. En effekt større end forventet har været benævnt bl.a. synergisme, superadditivitet eller potentiering, mens en effekt mindre end forventet har været benævnt bl.a. antagonisme, subadditivitet og depotiering. For en mere detaljeret gennemgang af definitioner, teorier og referencemodeller henvises til det gennemførte litteraturstudium.

I andre sammenhænge er begrebet kombinationseffekt brugt som en terminologi for effekter, som er større end forventet på baggrund af effekten af de enkelte pesticider. I dette projekt forstås ved kombinationseffekt blot den samlede effekt af en pesticidblanding.

I nærværende projekt har vi undersøgt kombinationseffekter af udvalgte pesticider i 7 forskellige standardiserede testsystemer, som rutinemæssigt anvendes til at vurdere utilsigtede effekter på planter i det terrestriske og akvatiske miljø, alger, akvatiske bakterier og dafnier samt pesticiders hormonforstyrrende aktivitet i pattedyrceller. Som udgangspunkt var det intentionen at sammenligne de to forskellige referencemodeller Additive Dose Model (ADM) og Multiplicative Survival Model (MSM) og vurdere hvilken model, der bedst beskrev effekten af pesticidblandinger. Sideløbende med nærværende projekt blev der publiceret en række artikler, som entydigt dokumenterede, under hvilke forhold de to modeller henholdsvis predikterede forskelle effekter og ens effekter (se Sammendrag af litteraturstudium). Med udgangspunkt i disse artikler var det muligt at forudsige, at i vore forsøg ville MSM altid prediktere en lavere effekt af

pesticidblandingerne end ADM, og dette blev ligeledes bekræftet af de statistiske analyser af projektets første resultater. Som konsekvens heraf blev fokus rettet imod at videreudvikle den model, som predikerede den højeste kombinationseffekt, idet denne model umiddelbart er den mest interessante set i et risikovurderingsperspektiv.

Formålet med projektet var at sammenholde resultater fra de forskellige testsystemer med henblik på at vurdere i hvilken udstrækning, det var muligt, med udgangspunkt i pesticidernes virkemåde, at generalisere vedrørende kombinationseffekter af pesticider på tværs af testsystemerne.

## 2 Statistiske metoder til vurdering af kombinationseffekter

Effekter af blandinger af kemikalier evalueres ofte i forhold til en af to referencemodeller: koncentrationsadditionsmodellen eller effektmultiplikationsmodellen. Koncentrationsadditionsmodellen kaldes også Additive Dose Model, og i denne rapport bruges derfor forkortelsen ADM. Effektmultiplikationsmodellen benævnes også den Multiplikative Survival Model, og derfor anvendes forkortelsen MSM (Streibig and Jensen 2000).

### 2.1 ADM eller MSM?

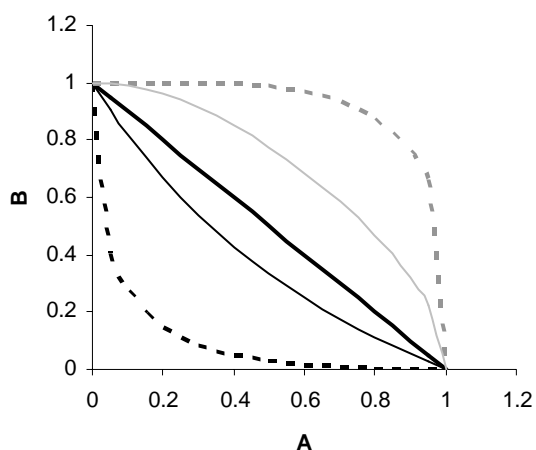
Greco et al (1995) gennemgik i et omfattende review brugen af de to referencemodeller samt en række af metoder, der har været anvendt til at evaluere data i forhold til modellerne (Greco et al.1995). Teoretisk set vil man kunne forvente, at blandinger af stoffer, der har samme virkningsmekanisme, vil følge ADM, hvorimod stoffer, der påvirker forskellige processer i en organisme, vil følge MSM, såfremt der er tale om diskrete responsvariabler. Nyere studier har da også vist, at effekten af blandinger af stoffer med samme virkningsmekanisme kan beskrives tilfredsstillende med ADM (Altenburger et al.2003; ECETOC1993; Faust et al.2001; Junghans et al.2003b; Junghans et al.2003a).

Undersøgelserne har imidlertid også vist, at forskellen mellem ADM og MSM sjældent er stor nok til, at man på baggrund af forsøgsdata har kunnet bestemme, hvilken model der beskrev data bedst. Det betyder, at effekten af blandinger af stoffer med forskellige virkningsmekanismer derfor ofte også kan beskrives tilfredsstillende med ADM (Backhaus et al.2004; Backhaus et al.2000; Faust et al.2003; Faust and Scholze2004). Det gælder ikke mindst, når effektestimaterne skal anvendes i en reguleringssammenhæng, hvor der i forvejen anvendes sikkerhedsfaktorer (Faust and Scholze2004).

En sammenligning af data fra tokomponent blandinger af herbicider på andemad og alger med de to modeller viste, at forskellen mellem ADM og MSM isobolerne som oftest var for lille til, at man visuelt kunne vurdere, hvilken af de to modeller, der beskrev data bedst. Dette skyldes den forholdsvis lave relativ hældning på enkeltstoffernes dosis-respons kurver. Graden af kurvatur af MSM isobolen afhænger nemlig af den relative hældning på enkeltstoffernes dosis-responskurver (Cedergreen and Streibig2004; Dreschner and Boedeker1995). Der eksisterer derfor et hældningsinterval, hvor de to modeller stort set er sammenfaldende (Figur 1). Dette hældningsinterval ligger for hældningsparametre lidt over 1 for den log-logistiske doseringskurve (model 1) (Cedergreen and Streibig2004). Da hældningerne på de enkelte doseringskurver ligger omkring 1-2 for samtlige stoffer testet på andemad og alger (Cedergreen et al.2003), kan dette forklare den lille forskel mellem de to modelleres effekt forudsigelser. For de øvrige testsystemer i nærværende projekt gælder det, at hældningen af doseringskurverne for de undersøgte pesticider typisk var signifikant større

end 1. MSM modellen for disse kurver ville derfor prediktere en betydelig lavere effekt af en given blanding end en prediktering med ADM modellen.

Da ADM modellen derfor er den mest konservative model, altså den model der predikterer den største effekt af en given blanding, er det oftest denne model der bruges som referencemodel i en risikovurderingssammenhæng (ECETOC1993; Faust and Scholze2004; Grimme and Backhaus2003). Vi har derfor valgt at udvikle en statistisk test, der kan teste for signifikante afvigelser fra ADM på  $EC_{50}$  effektniveauet.

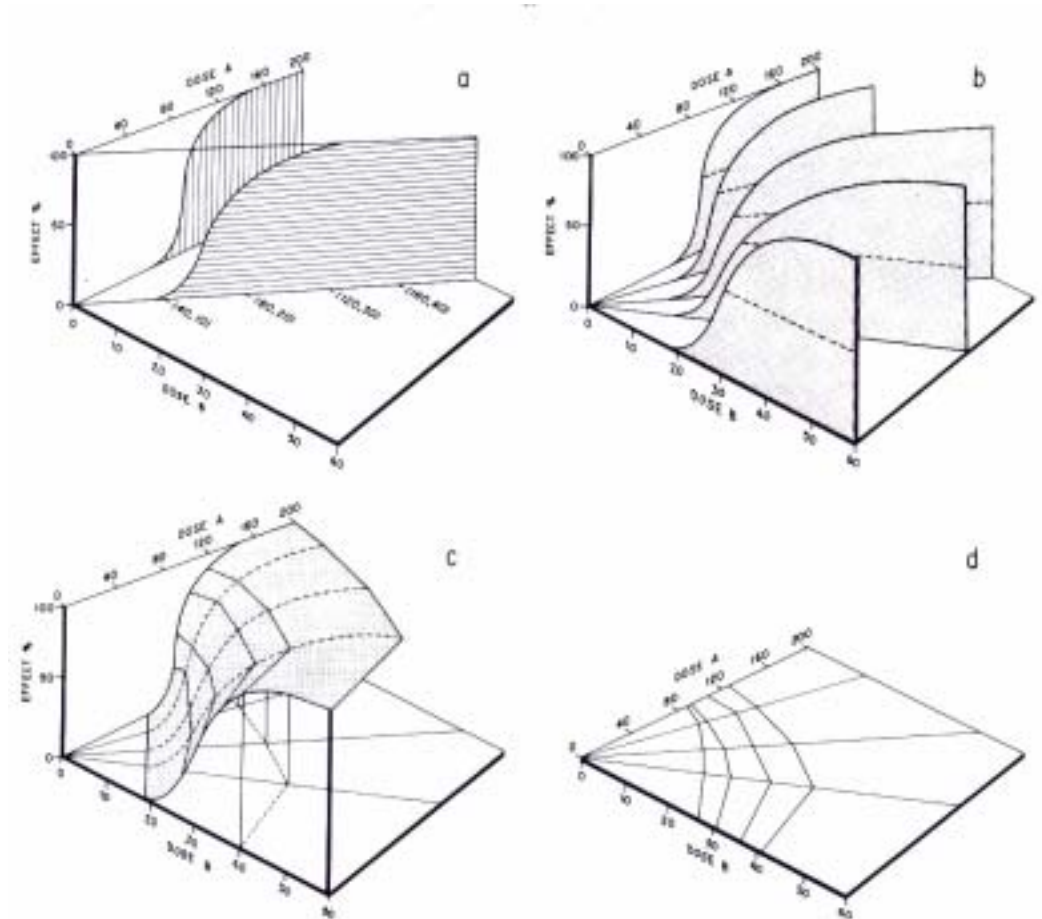


Figur 1. MSM isoboler beregnet ud fra kurver på enkel tstofferne A og B, hvor hældningerne var henholdsvis: 0,5 og 0,5 (Sort stiplede kurve), 1 og 1 (Tynd sort kurve), 2 og 2 (Grå tynd kurve) samt 5 og 5 (Grå stiplede kurve). ADM isobolen er vist med en kraftig sort kurve.

## 2.2 Et-trins modellen

Forsøgene med tokomponent blandinger i dette projekt er opbygget som et klassisk "stråledesign" (Gessner1995; Greco et al.1995). Dette indebærer, at både enkeltstofferne og tre til fem blandingsforhold testes i forskellige koncentrationer, hvorved man får beskrevet en dosis-respons overflade for den pågældende blanding, som vist i Figur 2.

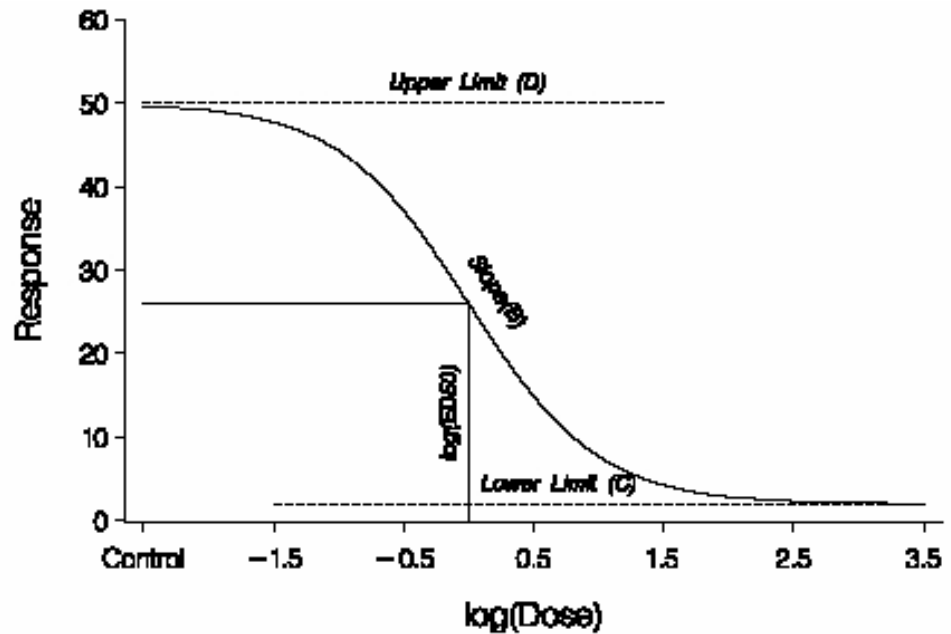
Overfladens form kan beskrives vha. konturplot som svarer til "højdekurve" (Figur 2c), der beskriver topografien i et landskab på et kort. "Højdekurver" på dosis-respons fladen er et udtryk for de kombinationer af de to stoffer, som giver en bestemt effekt. Deres projektion på x-y planet kaldes isoboler (Figur 2d). Traditionelt har man vurderet effekter af tokomponent blandinger enten visuelt, ved at vurdere isobolens form i forhold til ADM isobolen, eller punktvis, ved at forholde en målt effekt med en effekt beregnet vha. referencemodellen (Greco et al.1995). Disse tilgange ignorerer den information, der ligger i data udenfor isobolen eller udenfor det punkt, man er interesseret i.



Figur 2. En illustration af "stråle-forsøgsdesign" og de deraf udledte isoboler hentet fra Gessner et al (1995). Effekten som funktion af koncentrationen af de to kemikalier vises i a) for stoffet A og for et blandingsforhold mellem A og B, i b) vises dosis-responsforløbet af de to enkeltstoffer sammen med dosis-responsforløbet af tre blandingsforhold, i c) vises dosis-responsfladen og i d) vises isobolernes projektion på xy-fladen.

Der er gjort forsøg på at inddrage alle data i en samlet overflademode efter nogenlunde de samme retningslinier beskrevet af Streibig et al. (1998). Ingen andre har valgt at koble overflademodellerne til isobol-konceptet (Greco et al.1995; Haas et al.1996; Haas et al.1997; Haas and Stirling1994; White et al.2004). I forbindelse med dette projekt blev der derfor udviklet en statistisk model, der på baggrund af alle data kunne teste, om 50% effekt isobolen var signifikant forskellig fra ADM isobolen. Lignende modeller vil kunne udvikles for andre effektniveauer som f.eks.  $EC_{10}$ , men vi tog udgangspunkt i  $EC_{50}$ , da det er det effektniveau, der kan beskrives med mindst usikkerhed. Efterfølgende vil denne model blive kort beskrevet. En mere detaljeret beskrivelse findes hos (Sørensen et al., 2005a).

Den statistiske model består af flere trin. I det første trin bliver alle forsøgets doseringskurver beskrevet med en log-logistisk doseringsmodel (Figur 3).



Figur 3. Den log-logistiske dosis-responsmodel, hvor  $D$  beskriver kurvens øvre grænse,  $C$  beskriver den nedre grænse,  $ED_{50}$  beskriver kurvens placering på x-aksen og  $B$  er proportional med hældningen af kurven i punktet dosis =  $ED_{50}$ .

Formlen for den log-logistiske model ser ud som følger:

$$U = C + \frac{D - C}{1 + (dose/ED_{50})^B} \quad (1)$$

hvor  $U$  angiver responsen af det givne test-system, kontrolbehandlingen angiver den øvre grænse ( $D$ ), mens effekten af de højeste doseringer angiver den nedre grænse ( $C$ ). Ofte er den nedre grænse lig med nul. Parameteren  $B$  angiver hældningen omkring  $ED_{50}$ , som angiver den dosering der skal bruges for at halvere væksten 50% mellem de to grænser,  $D$  og  $C$ . For et forsøg med f.eks. fem blandinger, hver i et faste forhold har vi i alt syv doseringskurver, to for hver pesticid doseret enkeltvis og fem for hver af blandingsforholdene. Det er vigtigt, at blandingsforholdene er valgt, så de fordeler sig jævnt mellem de to enkeltstoffer, således at hele responsoverfladen (Figur 2c) bliver godt beskrevet af data. I første trin af den statistiske analyse bliver alle syv kurver beskrevet simultant i én model. Vi arbejder i dette projekt enten med 3 eller 5 blandingsforhold, hvilket vil sige 5 eller 7 doseringskurver per tokomponentforsøg.

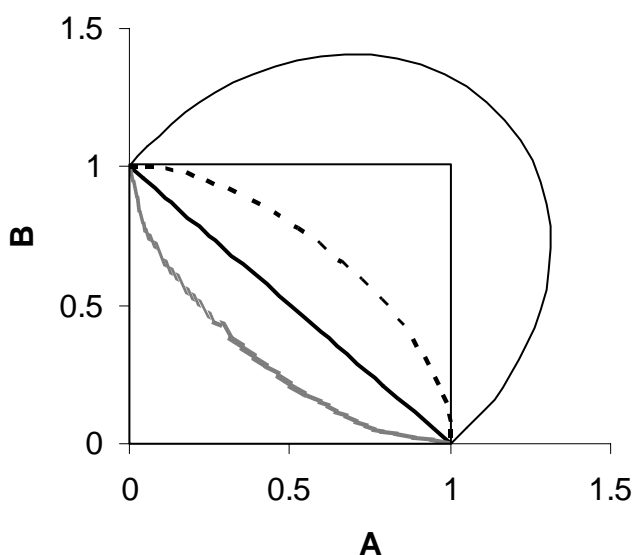
I det næste trin bliver data beskrevet med en model tilsvarende model 1, men hvor de relative hældninger,  $B$ , formodes at være ens for de 7 kurver. Modellen reduceres altså med 4-6 frihedsgrader afhængig af antallet af blandingsforhold. Denne model sammenlignes nu med model 1 med en  $F$ -test baseret på de to modellens residual sum of squares (Bates and Watts 1988). Dette gøres for at se, om det er statistisk legitimt at reducere model 1 til en model, hvor doseringskurverne har den samme hældning. Denne tests udføres, fordi isobolerne for en dosis respons overflade, hvor der ikke er signifikant forskel mellem hældningerne på de individuelle doseringskurver, vil være ens uanset effekt niveauet. Det betyder, at hvis der observeres antagonisme på  $ED_{50}$  niveauet, vil der være en tilsvarende antagonisme på  $ED_{10}$  eller  $ED_{90}$  niveauet. Hvis doseringskurvernes hældning

ikke er signifikant forskellige, arbejdes der i de efterfølgende analyser videre med en fælles hældning. Ellers fortsættes der med individuelle hældninger for doseringskurverne.

I det efterfølgende trin i den statistiske analyse bliver  $ED_{50}$  i model 1 erstattes med en isobolmodel. Vi har valgt at bruge en simpel isobolmodel, der kun indeholder en enkelt parameter til at beskrive isobolens krumning ( $\lambda$ ), samt  $ED_{50}$  værdierne fra enkeltstofferne A og B, hvor a og b er doser af stofferne A og B i blandinger, der giver en samlet effekt på 50% (Hewlett 1969) (Figur 4):

$$(a/ED_{50A})^{1/\lambda} + (b/ED_{50B})^{1/\lambda} = 1 \quad (2)$$

Når  $\lambda$  er lig med 1 følger isobolen ADM (Figur 4, sort fuldt optrukken kurve). Når  $\lambda$  er større end 1 er effekten af blandingen større end forventet ud fra ADM, og isobolen ligger indenfor ADM isobolen (Figur 4, grå kurve). En sådan respons defineres her som synergistisk. Er værdien af  $\lambda$  mindre end 1, har man en mindre end additiv respons, hvilket vi her har valgt at kalde en antagonistisk respons. Ved at erstatte de 5-7 frit varierende  $ED_{50}$  værdier med en 3-parameter isobolmodel reduceres den samlede model med yderligere 2-4 frihedsgrader. Model 1 eller eventuelt den forenkede model med ens hældning for samtlige doseringskurver, sammenlignes med model 2 med den samme  $F$ -test baseret på de to modellers residual sum of squares, for at se om det er statistisk forsvarligt at reducere modellerne med frit varierende  $ED_{50}$  værdier til model 2, der fikserer  $ED_{50}$  værdierne langs en veldefineret isobol. Hvis isobolmodellen bliver afvist, må man forholde sig til om det skyldes stor variation mellem de enkelte kurver, f.eks. at én af de 5 til 7 doseringskurver er dårlig beskrevet, eller om den manglende accept



Figur 4. Isobolmodel len beskrevet af Hewlett (1969) kan kun beskrive isoboler, der ligger indenfor det markerede kvadrat afgrænset af 1. Vi kan antage at figuren viser isoboler på  $ED_{50}$  niveauet. Den fuldt optrukne sorte kurve beskriver ADM isobolen, den grå kurve viser et eksempel på synergisme, mens den stiplede kurve viser et eksempel på antagonisme, beskrevet med Hewletts model. Antagonisme der ligger udenfor begrænsningerne på Hewletts model, kan beskrives med Vølund's model (Vølund, 1992).

skyldes, at isobolmodellen ikke formår at beskrive data. Hvis konklusionen er, at det skyldes meget variable data, kan man beslutte at fortsætte, med det forbehold at man ved, at ens data ikke opfører sig ideelt. Alternativt kan man vælge at anvende en model, der tager højde for, at der kan være ekstra variation imellem doseringskurverne, som er uafhængig af den variation, der findes mellem fortyndingerne indenfor den samme kurve. Denne ekstra variation kan f.eks. være opstået under blandingen af de to kemikalier, eller fordi de enkelte forsøg er kørt tidsmæssigt forskudt.

Med udgangspunkt i estimatet for  $\lambda$  er det muligt at kvantificere afvigelser fra ADM, idet man ved hjælp af udtrykket  $2^{1-\lambda}$  kan beregne, hvor meget doseringen af en 50:50 blanding skal ændres for at fastholde effekten (Sørensen et al. 2005a). Eksempelvis er det i tilfælde af antagonisme nødvendigt at øge doseringen af de to pesticider med 19%, hvis  $\lambda$  er 0.75 ( $2^{1-0.75}=1.19$ ), mens doseringen af pesticiderne kan halveres i tilfælde af synergi, hvis  $\lambda$  er 2 ( $2^{1-2}=0.5$ ). Det er også muligt ved hjælp af  $\lambda$  at kvantificere afvigelser for andre blandingsforhold end 50:50 blandingen, men dette er mere kompliceret at beregne. Endvidere er 50:50 blandingen den blanding, hvor afvigelsen fra ADM er maksimal i tilfælde af, at  $\lambda$  er signifikant forskellig fra 1.

Hvis den manglende accept af isobolmodellen skyldes, at modellen ikke formår at beskrive data, kan man anvende en anden isobolmodel (Se nedenfor). Ellers køres der nu en fjerde test, hvor isobolmodellen, der tillader synergisme og antagonisme, erstattes med ADM isobolen. Dette svarer til at sætte lig med 1 i model 2. Denne model sammenlignes med model 2 med en *F*-test efter samme principper som før. Hvis *F*-testen ikke er signifikant, er isobolen ikke signifikant forskellig fra ADM isobolen. Det skal understreges, at ADM isobolen estimeres på baggrund af alle data. Det vil sige, at den rette isobol ikke nødvendigvis skærer i gennemsnittet for  $ED_{50}$  for de to enkeltstoffer, da også usikkerheden på bestemmelsen af disse tages med i beregningerne (se f.eks. Figur 7). Dette er modsat af den praksis man ofte ser, når afvigelser fra ADM vurderes visuelt eller punkt for punkt (Altenburger et al. 1990; Christensen et al. 2001). I disse tilfælde trækkes ADM isobolen mellem gennemsnittene på enkeltstofferne. Vi mener, det er mest korrekt også at inddrage den usikkerhed, der uvægerligt er på bestemmelsen af  $ED_{50}$  for enkeltstofferne indenfor det enkelte forsøg. Hvis det ikke gøres, vil en enkelt f.eks meget høj  $ED_{50}$  for et enkeltstof kunne føre til, at blandingen blev kategoriseret som synergistisk, selvom de resterende 6 kurver lå på ADM-isobolen. Når man inkluderer variationen på enkeltstofferne minimeres risikoen for at begå sådanne fejl.

Den anvendte isobolmodel (model 2) har nogle begrænsninger, idet den ikke kan beskrive asymmetriske isoboler, eller stærkt antagonistiske isoboler, der ligger udenfor området defineret af  $ED_{50A}$  og  $ED_{50B}$  (Figur 4). Da nogle af de undersøgte tokomponent blandingerne udviste meget stærk antagonisme blev en alternativ isobolmodel inkorporeret i det statistiske program. Denne model er beskrevet af Vølund (Vølund 1992) og brugt af Streibig et al. (1998):

$$(a/ED_{50A})^{\eta_1} (a/ED_{50A} + b/ED_{50B})^{1-\eta_1} + (b/ED_{50B})^{\eta_2} (a/ED_{50A} + b/ED_{50B})^{1-\eta_2} = 1 \quad (3)$$



I denne model beskriver parametrene  $\eta_1$  og  $\eta_2$  krumningen på isobolen og  $a$  og  $b$  er stadig de koncentrationer af pesticiderne A og B, som samlet i blandingen giver en 50% effekt. Når krumningsparametrene  $\eta_1$  og  $\eta_2$  begge er 1, beskrives ADM isobolen. Hvis  $\eta_1$  og  $\eta_2$  begge er mindre end 1, er responsen synergistisk og hvis  $\eta_1$  og  $\eta_2$  begge er større end 1 er der antagonisme. Hvis parametrene er forskellige, bliver isobolen asymmetrisk. Beskriver denne isobolmodel data tilfredsstillende, testes der ikke for afvigelse fra koncentrationsaddition, da en velbeskrevet, meget antagonistisk isobol klart vil være signifikant forskellig fra ADM isobolen.

Et-trins modellen er udviklet på baggrund af data fra akvatiske planter og alger, som opfylder betingelserne om, at alle enheder er testet samlet, og kun anvendt til analyse af resultaterne fra disse testsystemer. For blandingsforsøg, hvor man af praktiske årsager har været nødsaget til at splitte det samlede forsøgsdesign op, er to-trins modellen mere korrekt at bruge.

### 2.3 To-trins modellen

To-trins modellen tager højde for den situation, hvor der er ekstra variation mellem kurverne, som er uafhængig af den variation, der findes mellem fortyndingerne indenfor den samme doseringskurve. I denne model beskriver man i trin I doseringskurverne enkeltvis med en log-logistisk dosis-respons (model 1). Det betyder, at til forskel fra et-trins modellen kræver to-trins modellen ikke, at doseringskurverne estimeres simultant. I trin II bliver fordelingen af  $ED_x$ 'erne beskrevet med Hewlett's isobolmodel (model 2), hvor der tages højde for størrelsen af variationen på de enkelte  $ED_x$  estimater (Sørensen et al., 2005b).

Fordelen ved at anvende denne model er, at man kan få et udtryk for størrelsen af den ekstra variation der findes mellem forsøgene. Altså et udtryk for hvor godt eller dårligt data er beskrevet med en ideel isobolmodel. Ulempen er, at man ikke anvender alle data samlet, og at noget af informationen i det samlede datasæt går tabt mellem trin I og trin II. Denne model er derfor også betydelig mere konservativ end et-trins modellen, da testen for additivitet som følge af den reducerede mængde information, som indgår i testen, ikke har samme styrke. Af samme grund kan der heller ikke findes en eksakt  $p$ -værdi for, om isobolen er forskellig fra den additive model, men der opgives i stedet et  $p$ -interval. Den lave værdi i  $p$ -intervallet svarer til, at man antager at der ikke er nogen ekstra variation mellem kurverne, mens den høje  $p$ -værdi svarer til, at der er en ekstra variation mellem kurverne. Af samme årsag ligger den lave  $p$ -værdi for to-trins modellen ofte tæt op ad den  $p$ -værdi der opnås ved brug af et-trins modellen, når samme data testes i begge modeller (Sørensen et al., 2005b).

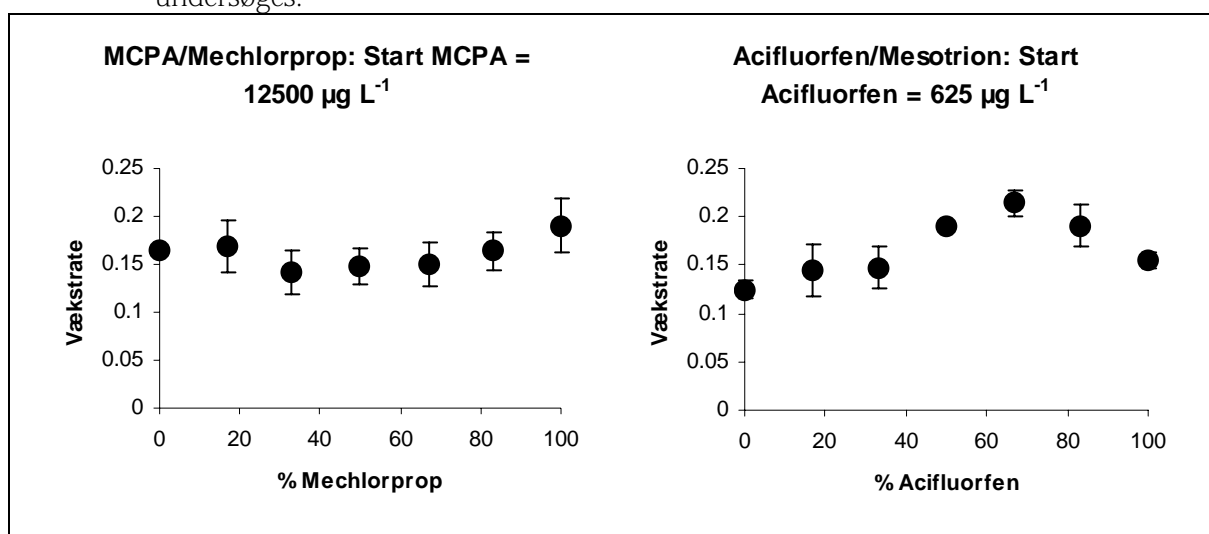
I nærværende projekt er to-trins modellen anvendt til at analysere resultaterne med terrestriske planter, akvatiske bakterier, dafnier samt hormonforstyrrende effekter. Det betyder, at for disse testsystemer var det ikke muligt at anvende Vølunds model (model 3) for de blandinger, som udviste store eller asymmetriske afvigelser fra ADM.

Både et- og to-trins modellen er programmeret i statistikprogrammet R (R Development Core Team 2004). Modellerne er udviklet med afsæt i data på

akvatiske planter og alger, men kan også anvendes på sigmoide kurver, der estimerer effekt og ikke respons, sådan som det er tilfældet i celleassayene.

## 2.4 Andre metoder

Der findes et væld af andre metoder til at evaluere effekten af blandinger. De fleste er meget reduktionistiske i forhold til de her beskrevne metoder (Altenburger et al., 2003; Greco et al., 1995). En af metoderne er, at se på effekten af blandinger, der følger en ADM-isobol. Det svare til at se på lodrette tværsnit af dosis-respons overfladen som følger forskellige prædefinerede ADM-isoboler (Figur 5). Metoden er brugt i situationer, hvor man er interesseret i, om man kan erstatte en bestemt dosis af et produkt, med en ækvipotent dosis af et andet produkt. Metoden kræver et betydeligt mindre forsøgsdesign, da det kun er et enkelt potentielt effekt-niveau, der undersøges.



Figur 5. Vækstraten af *Lemna minor* ved ekvipotente blandinger af MCPA og mechl orprop samt ved ekvipotente blandinger af Acifluorfen og Mesotrion på koncentrations-niveauer, der svarer til  $EC_{50}$  (den maksimale vækstrate er ca.  $0,30 d^{-1}$ ). Blandingen af MCPA og Mechlorprop er additiv (Appendix 3), hvorimod blandingen af acifluorfen og mesotrion er antagonistisk (Appendix 3), når blandingerne evalueres med isobol-metoden. En tilsvarende trend kan observeres i de viste figurer. Denne måde af afbillede blandinger svarer til, at man lægger et vertikalt snit ind i dosis-respons overfladen (Figur 2c) langs  $ED_{50}$  ADM-isobolen, modsat isobol metoden, hvor vi evaluere responsoverfladen ud fra vertikale snit/projektioner (isoboler). Metoden bruges i sammenhænge, hvor man af praktiske grunde er nød til at arbejde med reducerede forsøgsdesign.

## 2.5 Trekomponent blandinger

Effekten af trekomponent blandingerne blev evalueret visuelt vha. en figur, hvor ADM isobolplanet er indtegnet. Der findes ikke metoder til at evaluere trekomponent-blandinger statistisk, og en udvikling af sådanne metoder ligger udenfor det nærværende projekts formål. En visuel vurdering giver dog en stærk indikation af, om resultaterne af trekomponent blandingerne afviger markant fra det forventede. De binære blandinger, som indgik i forsøgene med trekomponent blandinger, blev evalueret med enten et- eller to-trins modellen.

# 3 Anvendte pesticiders fysisk-kemiske og biologiske egenskaber

Et af formålene med projektet var med udgangspunkt i resultaterne fra forskellige testsystemer at forsøge at drage generelle konklusioner om kombinationseffekter af pesticider med udgangspunkt i pesticidernes virkemåde. De pesticider, der er anvendt i projektet, er valgt dels ud fra deres fysisk-kemiske egenskaber og dels med udgangspunkt i deres biologiske egenskaber.

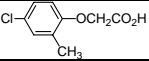
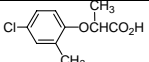
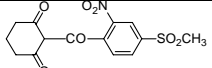
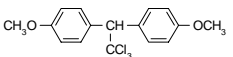
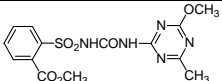
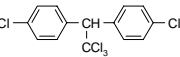
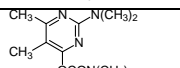
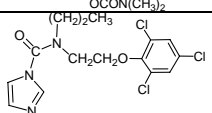
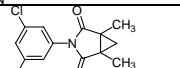
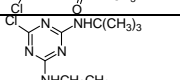
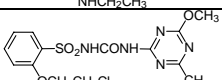
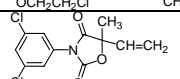
## 3.1 Pesticidernes fysisk-kemiske egenskaber

Det væsentligste fysisk-kemiske kriterium var, at pesticiderne var opløselige i de koncentrationer, som var nødvendige for at estimere doseringskurverne. I samtlige testsystemer anvendes vandbaserede vækstmedier, og der var kun muligt at anvende lave koncentrationer af organiske opløsningsmidler, da testorganismernes vækst ellers påvirkedes negativt. Således var det oprindeligt planen at undersøge effekter af blandinger med herbicidet pendimethalin i testsystemerne med bakterier og dafnier, men dette måtte opgives på grund af pendimethalins lave vandopløselighed.

I tabel 1 er vist de anvendte pesticiders kemiske struktur samt relevante fysisk-kemiske data.

Tabel 1. Anvendte pesticiders fysisk-kemiske egenskaber

Pesticid	Kemisk struktur	Fordelingskoefficient (logP)	Opløselighed i vand (g/L)	pKa
Aciflourfen-natrium (H)		1.19 (pH 5)	62.07 (pH 7)	3.86±0.12
Azoxystrobin (F)		2.5	0.006	
Chlorfenvinphos (I)		3.85 ((Z)-isomer) 4.22 ((E)-isomer)	0.145	
Dimethoat (I)		0.704	23.3	
Diquat dibromid (H)		-4.60	700	
Endosulfan (I)		4.74	0.32	
Esfenvalerat (I)		6.22	0.000002	
Fenarimol (F)		3.69 (pH 7)	0.0137 (pH 7)	
Fenitrothion (I)		3.43	0.014	
Glyphosat-isopropylamin (H)		-5.4	1050	2.18±0.02 5.77±0.03

MCPA –dimethylamin(H)		-0.71 (pH 7) (MCPA)	270 (MCPA-natrium)	3.07
Mechlorprop-kalium (H)		0.10 (pH 7) (mechlorpop-P)	920	3.78
Mesotrion (H)			2.2 (pH 4.8) 15 (pH 7)	3.12
Metoxychlor (I)			0.00001	
Metsulfuron-methyl (H)		-1.74 (pH 7)	0.55 (pH 5) 2.79 (pH 7)	3.3
<i>o,p</i> -DDT (I)			Uopløselig	
Pirimicarb (I)		1.7	3	4.44
Prochloraz (F)		4.12	0.0344	3.8
Procymidon (F)		3.14	0.0045	
Terbutylazin (H)		3.21	0.0085	2.0
Triasulfuron (H)		1-1 (pH 5) -0.59 (pH 6.9)	0.0032 (pH 5) 0.815 (pH 7)	4.64
Vinclozolin (F)		3	0.0026	

F=fungicid, H=herbicid, I=insekticid

### 3.2 Anvendte pesticiders biologiske egenskaber

Modsat andre miljøfremmede stoffer er pesticiders virkning over for målorganismer som ukrudt, patogene svampe og skadedyr velkendt. Biologisk klassificeres pesticider enten via deres virkemåde ("mode of action"), som beskriver effekten på fysiologisk niveau, eller virkningsmekanisme ("site of action"), som er en beskrivelse af effekten på molekylært eller biokemisk niveau.

For at eksemplificere forskellen på virkemåde og virkningsmekanisme kan nævnes, at både acifluorfen, diquat, mesotrion og terbutylazin hæmmer fotosyntesen, men de 4 herbiciders virkningsmekanismer er forskellige (Devine & Duke, 1998). Acifluorfen blokerer enzymet protoporphyrinogen oxidase, som fører til en høj koncentration i cytoplasma af protoporphyrin IX. Protoporphyrin IX er et fotodynamisk pigment, der reagerer med ilt og danner reaktive iltradikaler, som ødelægger cellemembranerne, hvilket bl.a. resulterer i, at fotosyntesen blokeres. Diquat reagerer med en elektron fra fotosystem 1, hvilket resulterer i en reduceret form af diquat, som reagerer med ilt og danner et superoxid radikal ( $O_2^-$ ) og brintoverilte ( $H_2O_2$ ). Disse to forbindelser reagerer efterfølgende med hinanden, hvilket resulterer i dannelse af hydroxyl- og iltradikaler, som fører til ødelæggelse af membranerne i cellerne. Mesotrion blokerer enzymet *p*-hydroxyphenylpyruvat dioxygenase, der er et af enzymerne involveret i syntesen af plastoquinon. Plastoquinon er en co-faktor for enzymet phytoene desaturase, der er et af enzymerne i syntesevejen af karotein. Karotein er et

af flere pigmenter, som planterne danner for at beskytte sig mod de iltradikaler og andre radikaler, som løbende genereres, når planter er fotosynteseaktive. Planter uden karotiner vil blive ødelagt, som følge af at cellemembranerne ødelægges. Terbutylazin blokerer for elektrontransporten i fotosystem II, hvilket resulterer i, at de exciterede klorofylmolekyler afgiver deres elektroner til karotiner og andre af planternes pigmenter i stedet for til elektronacceptoren Q. Planternes naturlige forsvarssystem overbelastes imidlertid hurtigt, og resultatet er som med acifluorfen, diquat og mesotrion, at der dannes frie radikaler, som ødelægger planternes membraner, hvilket bl.a. fører til nedbrydning af planternes klorofyl og dermed deres evne til at fotosyntetisere.

Blandt de pesticider, som opfyldte de praktiske kriterier, er der for hvert testsystem udvalgt et antal pesticider, således at det var muligt at inkludere blandinger af pesticider med henholdsvis 1) samme virkningsmekanisme, 2) samme virkemåde men forskellige virkningsmekanismer og 3) forskellige virkemåder. Det var ikke muligt at medtage alle 3 kategorier af blandinger i alle testsystemer. I tabel 1 er vist en oversigt over de pesticider, som indgik i projektet.

Tabel 2. Oversigt over anvendte pesticiders biologiske egenskaber.

Pesticid	Kemisk gruppe	Virkemåde ('mode of action')	Virkningsmekanisme ('site of action')
Acifluorfen-natrium (H)	Diphenylether	Fotosyntese	Protoporpyrinogen oxidase
Azoxystrobin (F)	Strobilurin	Respiration	Elektrontransport i mitokondrierne
Chlorfenvinphos (I)	Organofosfat	Nervesystemet	Cholinesterase
Dimethoat (I)	Organofosfat	Nervesystemet	Cholinesterase
Diquat dibromid(H)	Bipyridylum	Fotosyntesen	Fotosystem I
Endosulfan (I)*	Chlorhydrocarbon	Nervesystemet	Na pumpen
Esfenvalerat (I)	Pyrethroid	Nervesystemet	Na pumpen
Fenarimol (F)*	Pyrimidincarbinol	Ergosterolsyntese	C14 $\alpha$ - demethyleringen
Fenitrothion (I)*	Organofosfat	Nervesystemet	Cholinesterase
Glyphosat- IPA(H)	Organofosfor	Aromatiske aminosyrer	EPSP syntase
MCPA -DMA(H)	Phenoxysyre	Ukontrolleret vækst	Auxin imitator
Mechlorprop-K (H)	Phenoxysyre	Ukontrolleret vækst	Auxin imitator
Mesotrion (H)	Triketon	Fotosyntese	Karoten syntesen
Metoxychlor (I)*	Oragnofosfat	Nervesystemet	Cholinesterase
Metsulfuron-methyl (H)	Sulfonylurea	Forgrenede aminosyrer	Acetolactat syntase
<i>o,p</i> -DDT (I)*	Chlorhydrocarbon	Nervesystemet	Na pumpen
Pirimicarb (I)	Carbamat	Nervesystemet	Cholinesterase
Prochloraz (F)*	Imidazol	Ergosterolsyntese	C14 $\alpha$ - demethyleringen
Procymidon (F)*	Dicarboximid	Sporespiring	Ukendt
Terbutylazin (H)	Triazin	Fotosyntesen	Fotosystem II
Triasulfuron (H)	Sulfonylurea	Forgrenede aminosyrer	Acetolactat syntase
Vinclozolin (F)*	Dicarboximid	Sporespiring	Ukendt

F=fungicid, H=herbicid, I=insekticid,

\*pesticider som blev testet for hormonforstyrrende egenskaber. I disse testsystemer er den primære virkemåde og virkningsmekanisme ikke relevant. Der henvises i stedet for til tabel 3.

Modsat tokomponent blandingerne blev trekomponent blandingerne ikke sammensat med udgangspunkt i pesticidernes virkningsmekanisme/ virkemåde men derimod med baggrund i resultaterne med de respektive tokomponent blandinger. Formålet med forsøgene med trekomponent blandingerne var at undersøge, om man med et kendskab til responsen af 3 pesticider to og to kunne prediktere effekten af trekomponentblandingen.

I den udstrækning, at det var muligt, blev der anvendt de samme pesticider i de forskellige testsystemer (f.eks. terrestriske og akvatiske planter), således at direkte sammenligninger på tværs af testsystemerne var mulig. Det var

imidlertid ikke altid muligt, og i de tilfælde vil sammenligninger på tværs af testsystemer være baseret på sammenligninger af de 3 forskellige typer af pesticidblandinger nævnt oven for.

Østrogene og antiandrogene effekter skyldes bl.a., at en række pesticider er i stand til at binde sig til østrogen og/eller androgenreceptoren og aktivere (agonister) eller blokere (antagonister) receptoren (Andersen et al. 2002; Kojima et al. 2004). De pesticider, som indgår i dette projekt, er alle tidligere identificeret som østrogenreceptor agonister og/eller androgenreceptor antagonist. Herudover kan flere af pesticiderne påvirke enzymer, der er involveret i syntese og omsætning af steroidhormoner herunder aromatase, som omsætter androgener til østrogene, og derved indirekte påvirke det samlede hormonelle respons. Det er således relevant at teste kombinationseffekter af pesticider med både samme og forskellig virkningsmekanisme i nogle af de tests, der er foreslået som guidelinetests for hormonforstyrrende effekter.

Tabel 3. Oversigt over pesticider som er testet for hormonforstyrrende effekter og de relevante virkemekanismer i forhold til disse assays. Alle pesticiderne påvirker hormonsystemet (samme virkningsmåde) men repræsenterer forskellige virkningsmekanismer.

Pesticid	Site of action
Endosulfan	Østrogenreceptor agonist
Fenarimol	Østrogenreceptor agonist, androgenreceptor antagonist, aromatasehæmmer, påvirkning af andre enzymer involveret i steroidsyntese og metabolisme
Metoxychlor	Østrogenreceptor agonist, androgenreceptor antagonist,
<i>o,p</i> -DDT	Østrogenreceptor agonist,
Vinclozolin	Androgenreceptor antagonist
Procymidon	Androgenreceptor antagonist
Fenitrothion	Androgenreceptor antagonist
Prochloraz	Androgenreceptor antagonist, østrogen receptor antagonist, hæmning af CYP450 14-demethylase, aromatasehæmmer

Hvilke pesticidblandinger, der er anvendt i de forskellige testsystemer, fremgår af det efterfølgende kapitel, hvor de anvendte forsøgsteknikker er beskrevet. Enkelte af de anvendte pesticider er enten ikke markedsført i Danmark, eller de er på forbudslisten. Disse pesticider er medtaget, fordi de enten udviser effekt i de valgte testsystemer, eller fordi de repræsenterer en virkemåde eller virkningsmekanisme, som er ønskværdig set i relation til projektets overordnede formål.

## 4 Materialer og metoder

I dette kapitel beskrives den anvendte forsøgsteknik for hvert af de 7 testsystemer herunder hvilke to- og trekomponent pesticidblandinger, der er undersøgt.

### 4.1 Terrestriske planter

Modsat akvatiske planter, alger, bakterier og akvatiske dyr er der ikke i samme udstrækning tradition for at anvende standardiserede metoder i studier med terrestriske planter. Der er udviklet standardiserede metoder såsom OECD Guideline 208, som p.t. er under revision, samt ISO 11269. Disse testmetoder er udviklet til studier, hvor formålet er at bestemme eventuelle effekter på spiring, rodvækst og tidlig vækst af kemiske stoffer herunder pesticider inkorporeret i jordmatricen. I studier, hvor man ønsker at undersøge effekter på terrestriske planter ved eksponering af de overjordiske plantedele, kan man ikke henholde sig til officielle guidelines. I dette projekt er der derfor anvendt en dyrkningsteknik, som er udviklet ved DJF i Flakkebjerg og har været anvendt der i en årrække.

#### 4.1.1 Dyrkningsteknik

Frø af lugtløs kamille (*Tripleurospermum inodorum*) og alm. fuglegræs (*Stellaria media*) blev sået i 2 liter pletter i et dyrkningsmedium bestående af jord, sand og sphagnum (2:1:1 w/w) tilsat alle nødvendige næringsstoffer. Planterne voksede enten udendørs eller i væksthuse afhængig af tidspunktet på året. I væksthuse blev der suppleret med kunstigt lys, såfremt dette var nødvendigt. Planternes udviklingstrin på behandlingstidspunktet varierede fra 4 til 8 blade. Forsøgene blev afsluttet 4-5 uger efter behandling, hvor der blev målt frisk- og tørvægt af de overjordiske plantedele.

##### 4.1.1.1 Eksponering

I forsøgene med tokomponent blandinger blev planter af lugtløs kamille og fuglegræs behandlet med 6 eller 7 doseringer af henholdsvis 2 pesticider og 3 tokomponent blandinger af de 2 pesticider. Hver behandling havde 3 replikater med undtagelse af kontrollen, hvor der var 6 replikater. Forholdet mellem pesticiderne i tokomponent blandingerne blev fastlagt med udgangspunkt i de forventede ED<sub>50</sub> doseringer af de 2 pesticider, således at de to pesticider, under antagelse af ADM, ville bidrage med henholdsvis 25 og 75, 50 og 50 samt 75 og 25% af den samlede effekt af blandingerne. I tabel 4 er vist en oversigt over de blandinger, som er undersøgt, med angivelse af, om der er tale om blandinger af pesticider med samme virkningsmekanisme, samme virkemåde men forskellige virkningsmekanismer eller forskellige virkemåder. Forsøgene er gentaget, såfremt valg af doseringer eller blandingsforhold ikke var ensartet fordelt langs henholdsvis doseringskurven og isobolen.

Tabel 4. Tokomponent blandinger undersøgt på terrestriske planter.

Blandingstype	Sammensætning af blanding
Samme virkningsmekanisme	Metsulfuron + Triasulfuron MCPA + Mechlorprop
Samme virkemåde med forskellige virkningsmekanismer	Acifluorfen + Diquat Acifluorfen + Mesotrion Acifluorfen + Terbutylazin Diquat + Mesotrion Diquat + Terbutylazin Mesotrion + Terbutylazin
Forskellige virkemåder	Glyphosat + Metsulfuron Glyphosat + Terbutylazin Mechlorprop + Glyphosat Mechlorprop + Metsulfuron Mechlorprop + Terbutylazin Mesotrion + Glyphosat Mesotrion + Mechlorprop Mesotrion + Metsulfuron Metsulfuron + Terbutylazin

Trekomponent blandingerne er kun undersøgt på lugtløs kamille. I disse forsøg blev planterne behandlet med 7 doseringer af henholdsvis 3 pesticider, 9 tokomponent blandinger (3 blandinger med hver af de 3 mulige tokomponent blandinger) samt 4 trekomponentblandinger. Forsøgene med trekomponent blandinger tjener således også som en ekstra gentagelse af forsøgene med tokomponent blandinger. I alt 4 trekomponent blandinger blev undersøgt og sammensætningen af disse var baseret på resultaterne fra forsøgene med tokomponent blandinger. Forholdet mellem pesticiderne i tokomponent blandinger blev fastlagt, som beskrevet ovenfor, mens forholdet i de 4 trekomponent blandinger blev fastlagt ud fra et forventet effektbidrag (under antagelse af ADM) af de enkelte pesticider på henholdsvis 33, 33 og 33%, 60, 20 og 20%, 20, 60 og 20% samt 20, 20 og 60%. I tabel 5 er vist en oversigt over de undersøgte trekomponent blandinger

Tabel 5. Trekomponent blandinger undersøgt på terrestriske planter

Resultater med tokomponent blandinger	Sammensætning af blanding
Alle blandinger additive	Glyphosat + Metsulfuron + Mesotrion
Alle blandinger antagonistiske	Glyphosat + Mechlorprop + Terbutylazin
To blandinger additive, en blanding antagonistisk	Glyphosat + Mechlorprop + Mesotrion
To blandinger additive, en blanding synergistisk	Acifluorfen + Mesotrion + Terbutylazin

I de fleste forsøg var forskellen imellem doseringerne en faktor 2, men i enkelte forsøg varierede doseringsfaktoren fra 2 mellem de lave doseringer til 3 mellem de højeste doseringer. Dette asymmetriske forsøgsdesign blev valgt for sikre en god beskrivelse af den øvre del af doseringskurven. Behandlingerne blev udført i en pottesprøjte udstyret med en bom med 2 almindelige hydrauliske dyser (Hardi ISO F-110-015). Pesticiderne blev udbragt i en væskemængde på ca. 150 l vand/ha.

#### 4.1.1.2 Dataanalyse

Doseringskurverne for de forskellige pesticider og pesticidblandinger blev beskrevet med en log-logistisk dosis respons model (Kudsk & Mathiassen, 2004), og isobolerne blev beregnet, som beskrevet i kapitel 2, ved brug af to-trins modellen (Sørensen *et al.*, 2005a). For enkelte blandingers



vedkommende var der tale om så kraftig en antagonisme, at de ikke kunne beskrives med Hewlett og Plackets isobolmodel (Hewlett, 1969), og derfor var det ikke muligt at estimere en isobol.

#### 4.1.2 Akvatiske planter

Flydebladsplanter af slægten *Lemna* er de hyppigst anvendte vandplanter til test af væksthæmmende effekter af miljøfremmede stoffer, og de eneste for hvilke der er udviklet standardiserede testmetoder i bl.a. OECD og USEPA. De små, geografisk vidt udbredte planter, udmærker sig ved deres størrelse, der gør det let og pladsmæssigt overskueligt at dyrke dem under standardiserede laboratoriebetingelser. De har desuden en hurtig vækst, så væksthæmmende effekter hurtigt kan detekteres, og de er i kontakt med både vandfase, luftfasen samt overfladen, hvor mange stoffer har en tendens til at akkumulere. *Lemna* har derfor ofte vist sig at være en følsom plante overfor et bredt spekter af stoffer. Desuden formerer den sig vegetativt, så man kan arbejde med kloner og derfor kan se bort fra genetisk variation indenfor det enkelte forsøg. De to mest anvendte arter er *Lemna minor* og *Lemna gibba*, hvoraf vi anvendte den første i vores forsøg.

##### 4.1.2.1 Dyrkningsteknik

*Lemna minor* blev i 1999 indsamlet fra en lokal dam og planterne steriliseret j.f. (Landolt & Kandeler, 1987). En udvalgt klon opbevares i autoklaverede kolber i klimaskabe ved 24°C og en lysintensitet på 45 – 70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PAR) døgnet rundt. Klonens følsomhed overfor standard test-stoffer som Cr og 3,5-dichlorophenol (CAS-Nr.: 591-35-5) var tilsvarende andre standard kloner (ISO-ringtests). Vækstmediet er beskrevet af (Maeng & Khudairi, 1973) og havde en start pH på 5.

##### 4.1.2.2 Eksponering

Forsøgene er udført i 6-brønds TC Test Plates (CM Lab Aps), hvor der blev tilsat 10 ml vækstmedie med eller uden pesticid og én *Lemna* plante. Planterne blev fotograferet sammen med et standard areal og derefter placeret i klimaskab under de beskrevne vækstforhold. Efter 4 dage blev planterne fotograferet igen, og start- og slutareal blev bestemt ved digital billedbehandling. Den arealspecifikke vækstrate udregnedes som:  $(\ln(A_t) - \ln(A_0)) / t$ , hvor  $A_0$  er bladarealet ved forsøgets start,  $A_t$  er bladarealet ved forsøgets afslutning og  $t$  er forsøgsperioden opgivet i dage.

Hver doseringskurve består af 12 ubehandlede replikater samt 8 pesticidkoncentrationer med hver tre replikater. Hver binær blanding bestod af 5 blandingsforhold: 83:17, 67:33, 50:50, 33:67 og 17:83 samt de to pesticider alene, dvs. i alt 7 doseringskurver. I forsøgene med *Lemna minor* indgår de samme tokomponent blandinger, som i forsøgene på terrestriske planter (Table 4).

Forsøgene med trekomponent blandinger blev udført på tilsvarende måde men med 6 pesticidkoncentrationer for hver pesticid og pesticidblanding. I hvert forsøg indgik foruden de 3 pesticider, 9 tokomponent blandinger (3 med hver tokomponent blanding) samt 4 trekomponent blandinger. I tabel 6 er vist, hvilke trekomponent blandinger, der blev undersøgt. Sammensætningen af både to- og trekomponentblandingerne blev fastlagt som beskrevet for terrestriske planter i afsnit 3.2.1.2. Samtlige forsøg blev udført to gange.

Tabel 6. Trekomponent blandinger undersøgt på *Lemna minor*

Resultater med tokomponent blandinger	Sammensætning af blanding
Alle blandinger additive	Glyphosat + Mechlorprop + Mesotrion
Alle blandinger antagonistiske	Acifluorfen + Diquat + Mesotrion
To blandinger additive, en blanding antagonistisk	Mechlorprop + Mesotrion + Terbutylazin
En blanding additiv, to blandinger antagonistiske	Glyphosat + Mechlorprop + Terbutylazin

#### 4.1.2.3 Dataanalyse

Vækstraten blev afbilledet som funktion af pesticidkoncentrationen, og der blev fittet en log-logistisk dosis respons model (Cedergreen & Streibig 2003) for hver doseringskurve. Isobolerne beregnedes som beskrevet i kapitel 2 ved brug af et-trins modellen (Sørensen et al. 2005a) på nær en enkelt isobol, der kun kunne analyseres ved hjælp af to-trins modellen (Sørensen *et al.*, 2005b), da der var stor variation imellem de enkelte forsøg.  $EC_{10}$ -isobolerne er alle beskrevet med to-trins modellen, på nær de kurver, der udviste for kraftig antagonisme til at de kan beskrives med Hewlett og Plackets isobolmodel (Hewlett, 1969). Da Vølunds isobol model ikke er inkorporeret i to-trins modellen, blev disse isoboler derfor ikke indtegnede.

### 4.1.3 Alger

Undersøgelser af miljøfremmede stoffers effekt på alger bliver enten målt på naturlige algesamfund, hvor bl.a. ændringer i artssammensætning og populationsdynamik kan undersøges, eller på enkelte arter i renkultur, hvilket giver en større grad af reproducerbarhed og mulighed for at undersøge de fysiologiske mekanismer bag en given respons. En af de algearter, der ofte bruges, er grønalgen *Pseudokirchneriella subcapitata*, bedre kendt som *Selenastrum capricornutum*. Denne ferskvandsalge er geografisk meget udbredt og en god repræsentant for den store gruppe af grønalger. Desuden er den nem at holde suspenderet i kulturmediet modsat alger, der udskiller stoffer, der får dem til at klistre til overflader og hinanden.

En fri suspension sikrer en maksimal tilgængeligheden af lys, næring og kulstof, hvilket er en forudsætning for eksponentiel vækst, som er den fase, hvor algerne er mest følsomme overfor eksterne påvirkninger. Algernes vækst beregnes på baggrund af klorofylfluorescens, og det forudsættes dermed, at klorofylfluorescensen er proportional med biomassen. Dette er ikke helt korrekt, da klorofylfluorescens er et udtryk for algernes evne til at absorbere lys, der igen kan anvendes til at fikse kulstof og dermed ny biomasse. Under standardiserede vækstforhold kan lysfikseringspotentialet dog forventes at være proportionalt med vækstpotentialet og dermed også biomassen.

#### 4.1.3.1 Dyrkningsteknik

Algetesten er beskrevet af Arensberg *et al.* (1995) og (Mayer *et al.* (1997) og er i overensstemmelse med ISO's standardtest for alger (International Organization for Standardization, 1989). Klonen stammer fra Institut for Vannforskning (NIVA) in Norge, hvor den er kaldt NIVA-CHL 1. Forsøgene startes ved, at man tilsætter alger fra en stamkultur til 4 ml ISO Standard 8692 vækstmedie (pH 8) i en 20 ml vial tilsat pesticider.

Til måling af pigmentindholdet ved forsøgets begyndelse bliver der udtaget 400  $\mu$ l af algesuspensionen til et reagensglas med skruelåg, hvortil der bliver

tilsat 1,6 ml acetone mættet med  $\text{MgSO}_4$  ( $12 \text{ g l}^{-1}$ ). Prøverne stilles mørkt. Vialene med alger og vækstmedium placeres på et rystebord belyst nedefra med en intensitet på ca.  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (PAR). Rystebordet indstilles til 300 omdrejninger  $\text{min}^{-1}$ , hvilket sikrer god omrøring af algerne. Der udtages prøver på dag 1 og dag 2, på samme måde som ved forsøgets start, hvorefter forsøget afsluttes og slut pH måles. pH må ikke variere mere end 1 pH enhed. På dag 3 kan algernes pigmentfluorescens (primært klorofyl a) måles på et fluorometer med en excitation-bølgelængde på 420 nm og en emission-bølgelængde på 670 nm.

#### 4.1.3.2 Eksponering

Hver doseringskurve består af 10 replikater uden tilsat pesticider samt 8 pesticidkoncentrationer med hver to replikater. Hver binær blanding består af 5 blandingsforhold (83:17, 67:33, 50:50, 33:67 og 17:83) samt de to pesticider alene. Af tabel 7 fremgår, hvilke tokomponent blandinger, der blev undersøgt på alger.

Tabel 7. Tokomponent blandinger undersøgt på alger

Blandingstype	Sammensætning af blanding
Samme virkningsmekanisme Samme virkemåde med forskellige virkningsmekanismer	Metsulfuron + Triasulfuron
	Acifluorfen + Diquat
	Acifluorfen + Mesotrion
	Acifluorfen + Terbutylazin
	Diquat + Mesotrion
	Diquat + Terbutylazin
	Mesotrion + Terbutylazin
Forskellige virkemåder	Glyphosat + Terbutylazin
	Glyphosat + Metsulfuron
	Mesotrion + Glyphosat
	Mesotrion + Metsulfuron
	Metsulfuron + Terbutylazin

Stamopløsningerne blev pH-justeret med HCl eller NaOH, hvis nødvendigt. Algerne blev tilsat i en koncentration på ca.  $10\,000$  alger  $\text{ml}^{-1}$ . Koncentrationen på stamkulturen blev bestemt spektrofotometrisk.

#### 4.1.3.3 Dataanalyse

Algernes vækstrate udregnedes ved at udføre en lineær regression på den naturlige logaritme til fluorescensen på dag 0, 1 og 2 og angivet i enheden  $\text{dag}^{-1}$ . Vækstraterne i de ubehandlede forsøgsled lå mellem 1,6 og 2,0  $\text{dag}^{-1}$ . Doseringskurvernes forløb blev beskrevet med en log-logistisk doseringsmodel (Cedergreen & Streibig 2003), og isobolerne blev beregnet, som beskrevet i kap. 2, ved brug af et-trins modellen (Sørensen et al. 2005a).  $\text{EC}_{10}$ -isobolerne er alle beskrevet med to-trins modellen (Sørensen et al., 2005b) på nær de kurver, der udviste for kraftig antagonisme til at de kunne beskrives med Hewlett og Plackets isobolmodel (Hewlett, 1969).

### 4.1.4 Akvatiske bakterier

Microtox™ testen er en gennemprøvet og standardiseret metode som anvendes til screening af toksicitet i naturlige (blandings-) prøver (f.eks. ASTM Standard D-5660; ISO Draft 11348-3). I testen kvantificeres luminescensen hos bakterien *Vibrio fischeri*. Hos denne art udsendes lys som et biprodukt af metabolismen og enhver påvirkning af den cellulære aktivitet vil registreres som en ændring (reduktion) i luminescensen.

Sammenlignet med standardiserede *in vivo* test er Microtox testens følsomhed generelt lavere overfor toksiske stoffer, hvorimod dens præcision

ofte er højere end i *in vivo* test. Endvidere er der publiceret ED<sub>50</sub> værdier for mere end 1200 enkeltstoffer

#### 4.1.4.1 Dyrkningsteknik og eksponering

Inden forsøgene gennemførtes en opformering af en *Vibrio fisheri* kultur. Denne blev frysetørret og kan uden ændringer i viabilitet og følsomhed anvendes gennem flere måneder. Man er hermed sikret mod genetisk betingede ændringer i bakteriernes følsomhed. Gennem projektet blev der opformeret og anvendt 3 kulturbatch.

Microtox testen gennemførtes som korttidstest (5-30 min) i kulturbrønde og aflæsningen sker automatisk med selvregistrerende apparatur (Microtox Model 500 analyser).

Inden en forsøgsrunde overførtes frysetørrede bakterier til Microtoxmedium, pH indstilles til  $7.0 \pm 0.2$ , og suspensionen overførtes til kulturbrønde. Luminescensen blev målt efter 15 min (= kontrolværdi), der tilsattes pesticid (som enkeltstof, i to- eller trekomponent blandinger i 8 koncentrationer, hver koncentration i 2 replikater samt 4 kontroller), og luminescensen blev målt igen efter 5, 15 og 30 min. Effekten af pesticideksponering blev udtrykt som procent af kontrolmålingen (middel af 4 replikater) i den enkelte kulturbrønd. I 2002 blev det vist i forsøg med enkeltstoffer og i binære blandinger, at måling ved 30 min ikke adskilte sig fra målingen efter 15 min. Derimod skete der en øgning i variationen mellem replikater. På den baggrund blev måling af luminescens efter 30 min opgivet.

Hver binær blanding bestod af 3 blandingsforhold: 75:25, 50:50 og 75:25 samt de to pesticider alene. I tabel 8 er vist en oversigt over antal gennemførte Microtox test med pesticider i binære blandinger.

Tabel 8. Tokomponent blandinger undersøgt med Microtox test. Tallet i parentes angiver antal forsøg med blandingen. De to test med acifluorfen i blanding med chlorfenvinphos/dimethoat er gennemført henholdsvis med det rene stof og det formulerede produkt.

Blandingstype	Sammensætning af blanding
Samme virkningsmekanisme	Chlorfenvinphos+Dimethoat (1)
	Chlorfenvinphos+Pirimicarb (1)
Forskellige virkemåder	Dimethoat+Pirimicarb (1)
	Acifluorfen+Chlorfenvinphos (2)
	Acifluorfen+Dimethoat (2)
	Acifluorfen+Prochloraz (1)
	Azoxystrobin+Chlorfenvinphos (1)
	Azoxystrobin+Diquat (1)
	Azoxystrobin+Pirimicarb (1)
	Azoxystrobin+Prochloraz (1)
	Dimethoat+Prochloraz (1)
	Diquat+Pirimicarb (1)
Diquat+Prochloraz (2)	

Forsøgene med trekomponent blandinger blev udført på tilsvarende måde som ved tokomponent blandinger. I hvert forsøg indgik foruden de 3 pesticider i blandingsforholdene 60:20:20, 20:60:20, 20:20:60 og 33:33:33, 6 tokomponent blandinger samt 3 test med de rene stoffer. I en række af disse blandinger indgik tokomponent blandinger, som ikke var undersøgt i de indledende forsøgsserier med tokomponent blandinger. I tabel 9 er vist en oversigt over de tokomponent blandinger, som indgik i disse forsøg.

Tabel 9. Tokomponent blandinger undersøgt med Microtox test som led i forsøgene med trekomponent blandinger. Tallet i parentes angiver antal forsøg med blandingen. En asteriks angiver, at blandingen ikke er undersøgt i forsøgserierne med tokomponent blandinger.

Blandingstype	Sammensætning af blanding
Samme virkningsmekanisme	Chlorfenvinphos+Dimethoat (2)
Forskellige virkemåder	Acifluorfen+Dimethoat (2)
	Acifluorfen+Diquat (2)*
	Acifluorfen+Prochloraz (2)
	Azoxystrobin+Diquat (2)
	Azoxystrobin+Pirimicarb (2)
	Azoxystrobin+Prochloraz (1)
	Chlorfenvinphos+Prochloraz (1)*
	Dimethoat+Diquat (2)*
	Dimethoat+Prochloraz (3)
	Diquat+Pirimicarb (2)
	Diquat+Prochloraz (4)
	Pirimicarb+Prochloraz (1)*

Som følge af at en række af tokomponent blandingerne ikke tidligere var undersøgt var det ikke muligt at klassificere alle 8 trekomponent blandinger på samme måde, som det er gjort for terrestriske og akvatiske planter (Tabel 10).

Tabel 10. Trekomponent blandinger undersøgt med Microtox test.

Resultater med tokomponent blandinger	Sammensætning af blanding
Alle blandinger additive	Azoxystrobin+Diquat+Pirimicarb
	Acifluorfen+Dimethoat+Prochloraz
Alle blandinger synergistiske	Azoxystrobin+Diquat+Prochloraz
En blanding additiv, en blanding antagonistisk, en blanding synergistisk	Dimethoat+Diquat+Prochloraz
En blanding additiv, en blanding synergistisk, en blanding ukendt	Acifluorfen+Diquat+Prochloraz
En blanding additiv, en blanding antagonistisk, en blanding ukendt	Diquat+Pirimicarb+Prochloraz
En blanding additive, to blandinger ukendte	Chlorfenvinphos+Dimethoat+Prochloraz
	Acifluorfen+Diquat+Dimethoat

#### 4.1.4.2 Dataanalyse

Luminescensen blev aflæst inden samt efter 5 og 15 min efter tilsætning af pesticid (i 2002 også efter 30 min). I de tilfælde, hvor luminescensen varierede mere end 20% i de 2 replikater blev denne koncentration udeladt i beregningen af effektkoncentrationer. På basis af luminescensværdierne blev gamma-forholdet beregnet, som er defineret ved forholdet mellem luminescens tabet og den oprindelige luminescens (inden pesticid tilsætning) i den samme prøve. Gamma-værdierne blev korrigeret for tidlige ændringer i luminescensen (som var uafhængige af pesticidtilsætning) ved:

$$\gamma = \left[ \left( \frac{I_{tc}}{I_{0c}} \right) \left( \frac{I_0}{I_t} \right) \right] - 1$$

hvor  $I_{0c}$  og  $I_{tc}$  er luminescensen efter tid 0 og t (5 min, 15 min) i kontrolprøverne, og  $I_0$  og  $I_t$  er luminescensen efter tid 0 og t i pesticideksponeringerne.

Effektkoncentrationer ( $ED_{25}$  og  $ED_{50}$ ) blev beregnet ved lineær regression af  $\log_{10}$ -transformerede pesticidkoncentrationer og gamma-værdier. I flere tilfælde var det ikke muligt at beregne  $EC_{10}$  værdier uden meget store

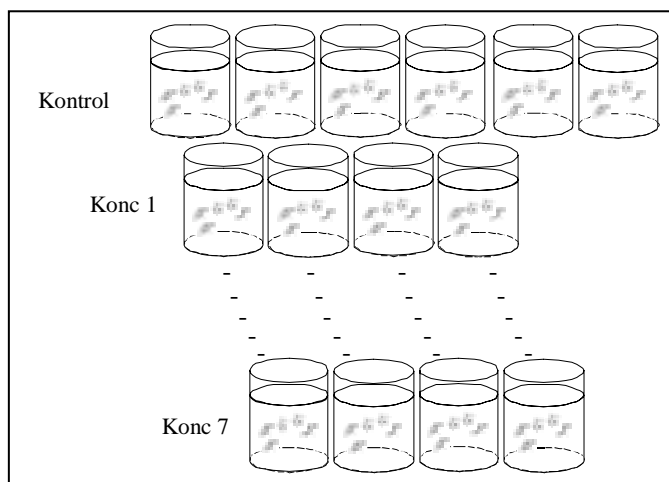
usikkerhedsintervaller. Dette skyldes hovedsageligt "mangel" på koncentrationer i den nedre del af doseringskurven, fordi variationen mellem replikater ofte oversteg 20%. ED<sub>25</sub>/ED<sub>50</sub> isobolerne blev beskrevet med to-trins modellen (Sørensen *et al.*, 2005b).

#### 4.1.5 Dafnier

Dafnier er den mest anvendte testorganisme til beskrivelse af toksiske stoffers effekt i vandmiljøet. Både akuttest (48 eller 96 timer) og kronisk test (reproduktionstest) er gennem en omfattende afprøvning og interkalibrering mellem laboratorier og lande løbende blevet udviklet til generelt accepterede standarder indenfor OECD, EU og EPA. Den gennemførte standardisering betyder, at man nøje kender organismernes miljøkrav (pH, iltkoncentration etc.) samt den naturlige variabilitet, som igen bestemmer antal replikater, for at effektdoser kan bestemmes med stor og kendt sikkerhed. I EPA's database "AQUIRE" er der registreret mere end 6000 bestemmelser af akut toksicitet overfor dafnier, heraf mere end 1100 for effekter af pesticider. Der foreligger således et meget stort reference-grundlag. Dafnier er nært beslægtede med insekter og påvirkes på samme måde og med nær samme følsomhed som de skadeinsekter, som de specifikt virkende insekticider er tiltænkt. For ikke-specifikt virkende stoffer regnes dafnier generelt blandt de mest følsomme akvatiske organismer.

##### 4.1.5.1 Dyrkningsteknik og eksponering

Forsøgene er gennemført med 24 timer gamle dafnier (*Daphnia magna*) fra en velfodret kultur. Til t = 0 overføres dafnier til 50 ml glas (5 i hver doseret med pesticider enkeltvist eller i blandinger (Figur 6). Døde (immobile) og levende dafnier i glassene noteres dagligt indtil 48 timer. Forsøgene gennemføres efter Dansk Standard uden fodring i ISO vand (DS/EN ISO 6341). Til kontrol af dafniernes relative følsomhed gennemføres jævnligt parallelforsøg med referencestof (ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O)).



Figur 6. Forsøgsdesign med dafnier. En screeningstest består af 4-5 koncentrationer + kontrol med 20 dyr i hver koncentration fordelt på 4 glas med 5 i hvert. I kontrol I en er der 30 dyr fordelt på 6 glas. En definitiv test gennemføres med 6-7 koncentrationer + kontrol + evt. kontrol med acetone. Efter 24 og 48 timer måles pH, O<sub>2</sub> og antal immobile dafnier.

Hver binær blanding bestod af 3 blandingsforhold: 75:25, 50:50 og 75:25 samt de to pesticider alene. I tabel 11 er vist en oversigt over antal gennemførte dafnie test med pesticider i tokomponent blandinger. Der er

udført ét forsøg med hver blanding med undtagelse af blandingen azoxystrobin+prochloraz, som er undersøgt i 2 forsøg.

Tabel 11. Tokomponent blandinger undersøgt på dafnier.

Blandingstype	Sammensætning af blanding
Samme virkningsmekanisme	Chlorfenvinphos+Pirimicarb
Forskellige virkemåder	Azoxystrobin+Chlorfenvinphos
	Azoxystrobin+Esfenvalerat
	Azoxystrobin+Pirimicarb
	Azoxystrobin+Prochloraz
	Chlorfenvinphos+Esfenvalerat
	Dimethoat+Prochloraz
	Diquat+Esfenvalerat
	Diquat+Pirimicarb
	Diquat+Prochloraz
	Esfenvalerat+Pirimicarb
	Esfenvalerat+Prochloraz

#### 4.1.5.2 Dataanalyse

Dafnietesten producerer binære data (individerne er enten mobile eller ikke-mobile  $\approx$  døde) og traditionelt beregnes dosis-respons sammenhængen og effektkoncentrationer ved probitanalyse (OECD, Finney 1976). Indenfor området  $ED_{10}$ - $ED_{90}$  er der god overensstemmelse mellem probitmodellen og den logistiske model (Halekoh 2004) og estimerede  $ED_{25/50}$  værdier på samme dafnie datasæt viste en variation på mindre end 1%. Efter dafnietestene blev afsluttet i 2003 beregnedes ED-værdier med anvendelse af probitanalyse, men for at gøre resultaterne kompatible med isobalberegningerne (som forudsætter angivelse af standardafvigelse på ED-estimerterne) blev beregningerne gentaget med anvendelse af en log-logistisk model (Cedergreen & Streibig 2003). Isoboler for  $ED_{25}$  og  $ED_{50}$  blev beskrevet med to-trins modellen (Sørensen et al. 2005b),

#### 4.1.6 MCF7 celleproliferationsassay

MCF-7 celle proliferationsassayet er baseret på en human brystcancer cellelinie, som differentierer og deler sig, når der er østrogen til stede. Proliferation af cellerne er således indikation for, at der er et kemisk stof til stede med østrogen aktivitet. Metoden anvendes rutinemæssigt flere steder herunder Miljømedicin ved Syddansk Universitet (Andersen et al., 1999) til screening for miljøkemikalier med østrogene egenskaber.

##### 4.1.6.1 Dyrkningsteknik og eksponering

MCF-7 celler udsås i 96 hullers mikrotiterplader. Efter 24 timer tilsættes en koncentrationsrække af testblandingen. Hver koncentrationsrække udføres i trippelsbestemmelse. Efter 6 dages inkubation bliver cellerne fikseret og farvet. Farveintensiteten, som er et mål for antallet af levende celler, aflæses i en ELISA-reader. Hvert forsøg inkluderer en standardrække af  $17\beta$ -østradiol (0,001 nM til til 10 nM). Det maksimale respons af  $17\beta$ -østradiol opnås ved 1 nM.

De pesticider, som indgik i undersøgelserne for østrogene egenskaber, var insekticiderne *o,p*-DDT, endosulfan og methoxychlor samt fungicidet fenarimol. Alle fire pesticider er klorerede organiske forbindelser. *o,p*-DDT og methoxychlor er persistente forbindelser, som er akkumuleret i miljøet, fødekæden og i humant væv. Endosulfan og fenarimol anvendes indenfor landbrug og gartneri i en række lande men er ikke godkendte i Danmark.

Blandingerne fremstilles ved fortynding af 10 mM stamopløsninger af pesticiderne opløst i ethanol (96%, Fluka Chemie, Schweiz). Fortyndingen sker i celledyrkningsmedium, og koncentrationen af ethanol i de fortyndede prøver overskrider ikke 0,5%. Testning af alle pesticider og blandinger er udført i mindst tre uafhængige forsøg, og i hvert af forsøgene er testningen udført som trippelbestemmelse. Af tabel 12 fremgår, hvilke tokomponentblandinger, der er undersøgt. Blandingerne *o,p*-DDT+endosulfan, endosulfan+fenarimol samt fenarimol+methoxychlor er undersøgt i blandingsforholdene 33:67, 50:50 samt 67:33%, mens blandingen *o,p*-DDT+methoxychlor er undersøgt i 5 blandingsforhold: 25:75, 33:67, 50:50, 67:33 og 75:25.

Tabel 12. Tokomponent blandinger undersøgt med MCF7-celleproliferationsassay

Blandingstype	Sammensætning af blanding
Samme virkningsmekanisme	<i>o,p</i> -DDT + Endosulfan
	<i>o,p</i> -DDT + Methoxychlor
Flere virkningsmekanismer	Endosulfan + Fenarimol
	Fenarimol + Methoxychlor

I forsøgene med trekomponentblandinger indgik blandingerne *o,p*-DDT+endosulfan+methoxychlor samt endosulfan+fenarimol+methoxychlor. Sammensætningen af både to- og trekomponentblandingerne i disse forsøg blev fastlagt, som beskrevet for terrestriske planter i afsnit 3.2.1.2.

#### 4.1.6.2 Dataanalyse

Resultaterne er angivet som den relative proliferative effekt (RPE), hvorved data normaliseres både i forhold til kontrolniveauet og det maksimale respons induceret af 17-østradiol (1 nM) i det respektive forsøg:

$$RPE = (PE_{\text{teststof}} - 1) / (PE_{\text{max 17-østradiol}} - 1)$$

hvor PE er responset normaliseret til 100.

For hver blanding afbildedes RPE som funktion af pesticidkoncentrationen, og der blev fittet en log-logistisk dosis respons model for hver doseringskurve ved hjælp af drc-pakken til R (Ritz & Streibig, 2005), hvorefter  $EC_{50}$  og  $EC_{10}$  værdierne blev estimeret. Isobolerne blev beregnet, som beskrevet i kapitel 2, ved brug af to-trins modellen (Sørensen et al. 2005a).

### 4.1.7 AR reporter genassay

Pesticidernes evne til at blokere androgen receptoren blev undersøgt ved hjælp af et reporter genassay for antiandrogene effekter (Vinggaard et al., 1999).

#### 4.1.7.1 Dyrkningsteknik og eksponering

Chinese Hamster Ovary celler (CHO K1) blev udsået i mikrotiterplader, og hver brønd blev transfekteret med 75 ng cDNA bestående af ekspressionsvektoren for den humane androgenreceptor pSVAR0 og et MMTV-LUC reporter plasmid i en ratio på 1:100 ved hjælp af 0.15  $\mu$ l af transfektionsreagenset FuGene. Androgenreceptor agonisten R1881 (0.1 nM) plus/minus pesticider blev tilsat, og efter en inkubationsperiode på 24 timer blev cellerne lyseret, og aktiviteten af den dannede luciferase blev målt i et BioOrbit Galaxy luminometer.



De pesticider, som indgår i testningen for antiandrogene egenskaber, er fungiciderne vinclozolin, procymidon, og prochloraz samt insekticidet fenitrothion. Alle fire pesticider er klorerede organiske forbindelser. Vinclozolin og procymidon anvendes ikke længere i Danmark pga. effekterne på hormonsystemet, mens prochloraz stadig anvendes inden for landbrug og gartneri.

Pesticiderne enkeltvis og i kombination blev undersøgt i 12 koncentrationer i området 0.025 – 50  $\mu\text{M}$  i firedobbelt bestemmelse, og forsøgene blev gentaget 3 gange. Af tabel 13 fremgår hvilke tokomponentblandinger, der indgik i forsøgene. Forholdet mellem pesticiderne i tokomponentblandingerne blev fastlagt med udgangspunkt i de forventede  $\text{EC}_{50}$  koncentrationer af pesticiderne, således at de to pesticider, under antagelse af ADM, ville bidrage med henholdsvis 25 og 75, 50 og 50 samt 75 og 25% af den samlede effekt af blandingerne. Dog blev blandingen af vinclozolin og procymidon undersøgt i de absolutte indbyrdes forhold 75:25, 50:50 og 25:75, uanset stofferne potens.

Tabel 13. Tokomponent blandinger undersøgt med AR reporter genassay

Blandingstype	Sammensætning af blanding
Samme virkningsmekanisme	Fenothrothion+Procymidon
eller	Fenothrothion+Vinclozolin
samme virkemåde med forskellige	Procymidon+Prochloraz
virkningsmekanismer	Procymidon+Vinclozolin
	Prochloraz+Vinclozolin

I forsøgene med trekomponentblandinger indgik blandingerne fenitrothion+procymidon+vinclozolin samt procymidon+prochloraz+vinclozolin. Sammensætningen af både to- og trekomponentblandingerne i disse forsøg blev fastlagt som beskrevet for terrestriske planter i afsnit 3.2.1.2.

#### 4.1.7.2 Dataanalyse

Rådata for enkeltstofferne og blandinger blev normaliseret, således at responset til 0.1 nM R1881 blev sat til 100%. For enkeltstofferne og hver blanding blev responset (inhibering af AR transkriptionel aktivitet) afbilledet som funktion af pesticidkoncentrationen og kurverne blev fittet til en log-logistisk dosis-respons model ved hjælp af drc-pakken til R (Ritz & Streibig, 2005), hvorefter  $\text{EC}_{50}$  og  $\text{EC}_{10}$  værdierne blev estimeret. Isobolerne blev beregnet, som beskrevet i kapitel 2 ved brug af to-trins modellen (Sørensen et al. 2005a).



# 5 Tokomponent blandinger

I dette kapitel præsenteres og diskuteres resultaterne fra de gennemførte forsøg med tokomponentblandinger. For overskuelighedens skyld vil resultaterne fra hvert testsystem blive præsenteret enkeltvis, mens den sammenfattende diskussion af resultaterne på tværs af testsystemerne vil blive foretaget i kapitel 6.

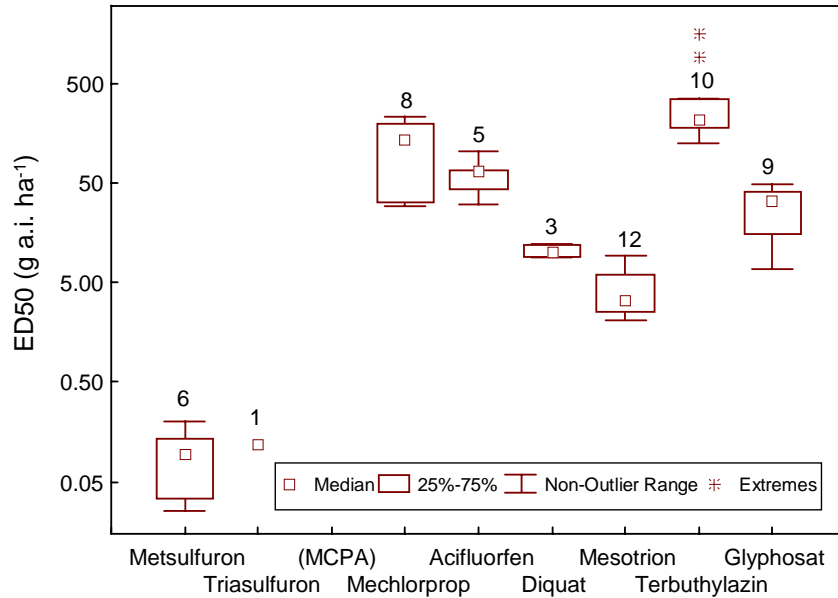
For hver binær blanding præsenteres ED/EC/IC<sub>10</sub> og ED/EC/IC<sub>50</sub> isobolerne. Forsøgene med akvatiske planter og alger er opgjort med et-trins modellen, mens resultaterne fra de øvrige testsystemer er analyseret med to-trins modellen (se kapitel 2). For hver blanding opgjort med et-trins modellen er angivet  $\lambda$  parameteren med standardafvigelse, som er et udtryk for isobolens kurvatur, samt p-værdien for F-testen for at isobolen er signifikant forskellig fra ADM isobolen. For de blandinger, som er analyseret vha. to-trins modellen er ligeledes angivet  $\lambda$  parameteren med standardafvigelse samt et interval for p-værdien.

## 5.1 Terrestriske planter

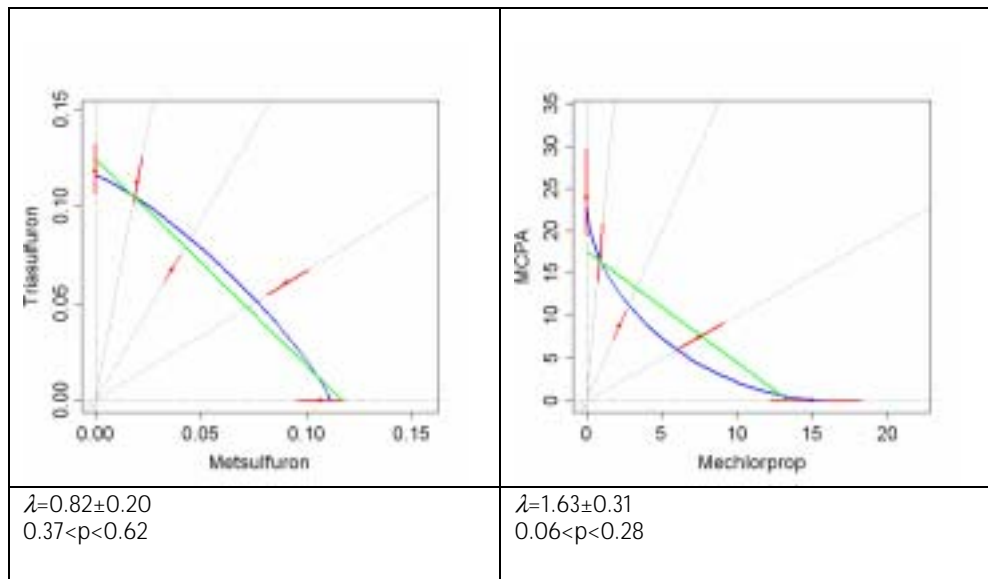
### 5.1.1 Lugtløs kamille

Med undtagelse af blandingen af glyphosat og metsulfuron var det muligt at estimere doseringskurver for samtlige herbicider og herbicidblandinger samt at estimere ED<sub>50</sub> og ED<sub>10</sub> doseringerne. Toksiciteten af de undersøgte herbicider varierede betydeligt med metsulfuron og triasulfuron som de mest toksiske, og mechlorprop og terbuthylazin som de mindst toksiske (op til 3000 gange mindre aktive) (Figur 7). Der blev observeret en forholdsvis stor variation i ED<sub>50</sub> doseringerne, hvilket bl.a. kan tilskrives, at forsøgene ikke er udført under standardiserede klimatiske forhold.

Estimeringen af doseringskurvene viste, at det kun i to tilfælde nemlig med blandingerne metsulfuron+triasulfuron samt mechlorprop+MCPA kunne antages, at doseringskurvernes hældning var identisk. Disse to blandinger er netop karakteriseret ved, at de to herbicider har samme virkningsmekanisme, og med baggrund i erfaringerne var tidligere forsøg, var det forventet, at doseringskurverne ville være parallelle (Streibig et al, 1983). Resultaterne med begge disse blandinger afveg meget lidt fra ADM isobolen (Figur 8). At der med samtlige tokomponent blandinger med herbicider med samme virkemåde blev fundet forskellige hældninger af doseringskurverne, understreger, at opdelingen af herbicidblandingerne i 3 grupper er biologisk relevant.



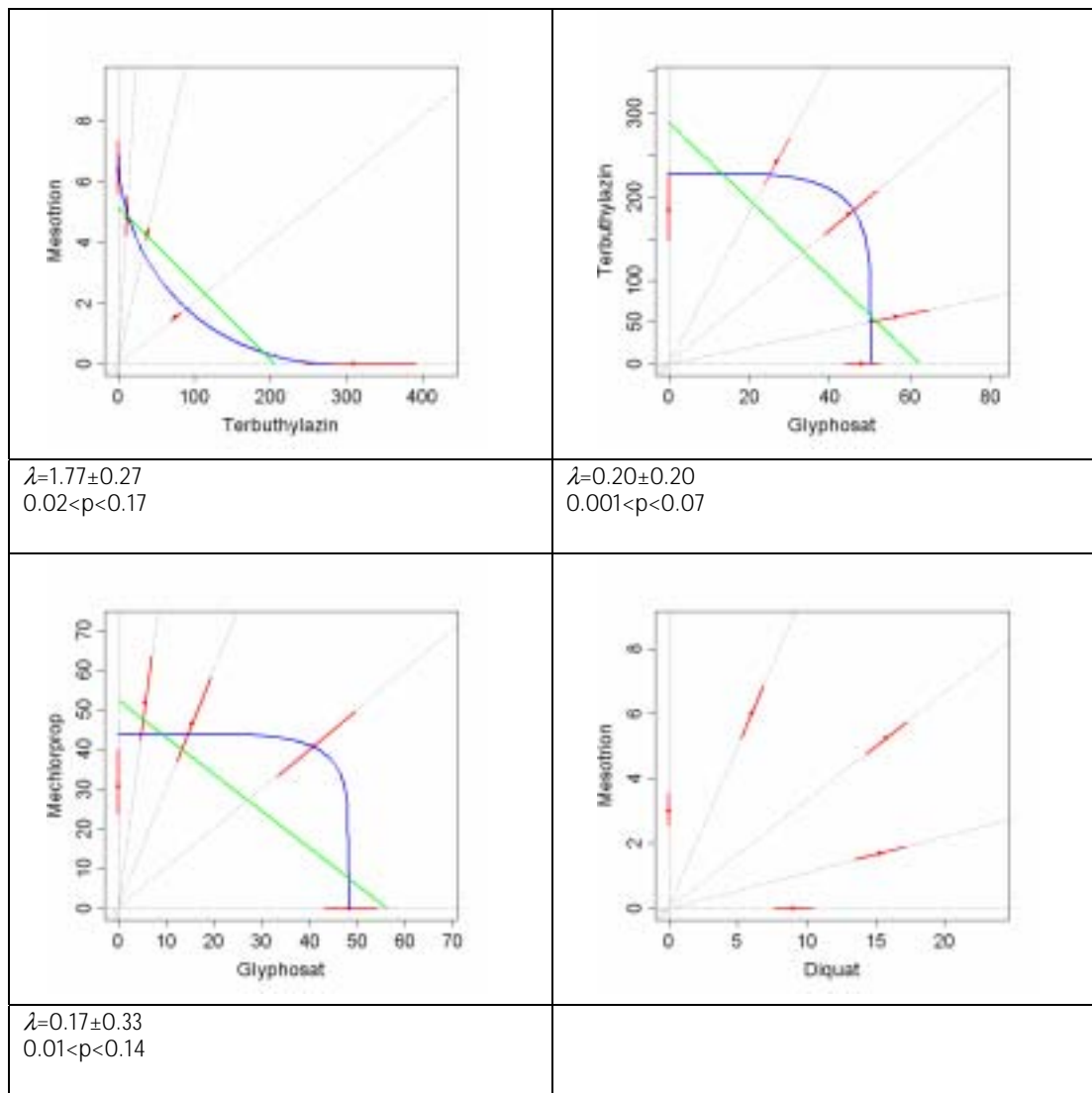
Figur 7. Box-Wiskers plot af ED<sub>50</sub> værdier af de 8 pesticider anvendt i forsøgene med lugtløs kamille. Tal lene i figuren angiver antal let af uafhængige test.



Figur 8. Estimerede ED<sub>50</sub> isoboler samt for blandingerne metsulfuron+triasulfuron og mechl orprop+MCPA, som repræsenterer blandinger af herbicider med samme virkningsmekanisme (den rette linie repræsenterer ADM modellen, mens den buede linie er beregnet på grundlag af de observerede data, som er vist som punkter med standardafvigelse).  $\lambda$  parameteren med standardafvigelse er et udtryk for isobolens kurvation, mens intervallet for p angiver sandsynligheden for, at isobolen er signifikant forskellig fra ADM isobolen

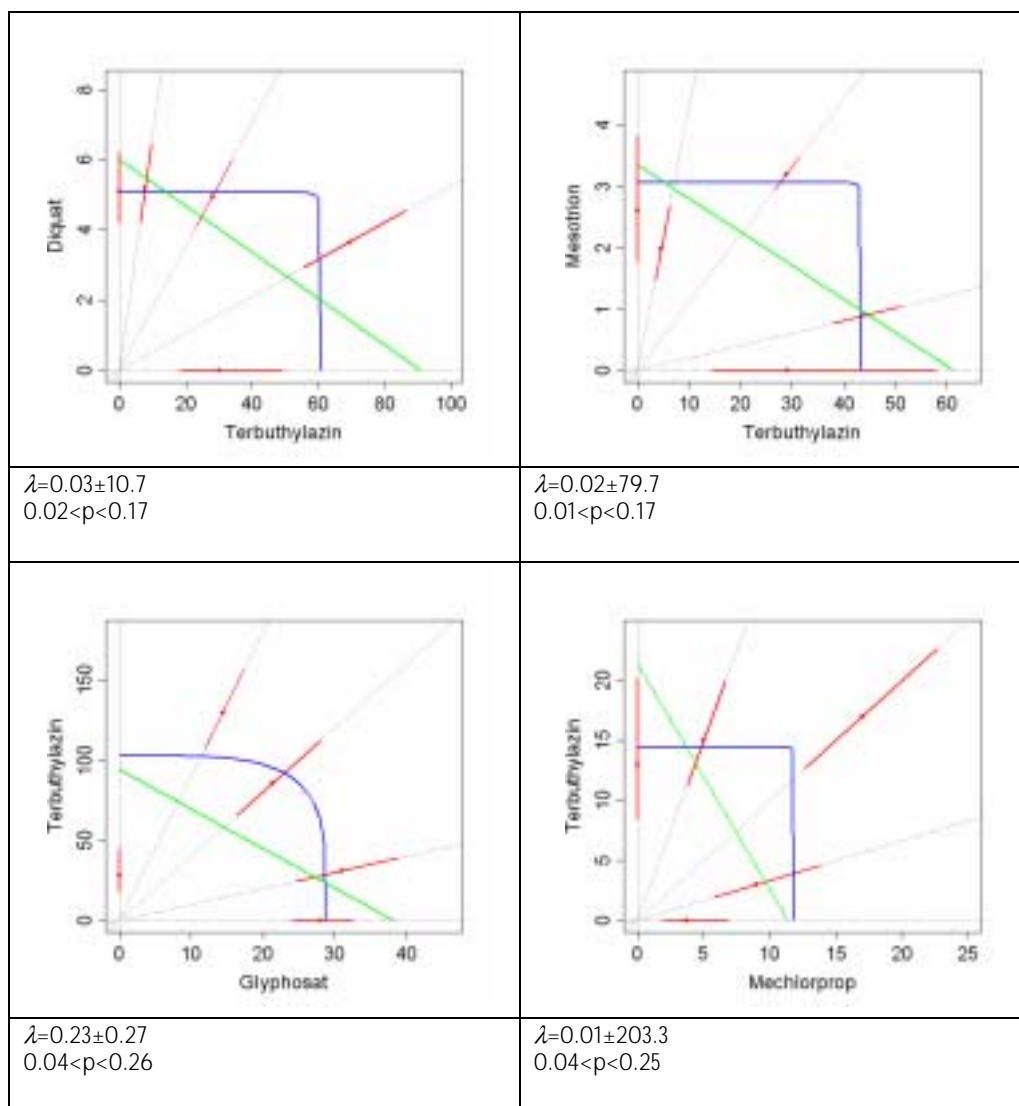
De estimerede ED<sub>50</sub> og ED<sub>10</sub> isoboler samt de observerede resultater er vist i Appendiks 1. Vurderet med udgangspunkt i den lave p-værdi blev der for ED<sub>50</sub> isobolernes vedkommende kun for 4 af de 16 blandinger observeret signifikante afvigelser fra ADM isobolen. Blandingerne glyphosat+terbuthylazin og glyphosat+mechl orprop udviste antagonisme

målt i forhold til ADM, mens mesotrion+terbuthylazin var synergistiske. Anvendes den øvre p-værdi var der ingen af blandinger, der afveg fra additivitet. Diquat+mesotrion udviste så markant antagonisme, at det ikke var muligt at estimere en isobol med to-trins modellen. I figur 9 er vist isobolerne for de ovennævnte 4 tokomponent blandinger.



Figur 9. Estimerede ED<sub>50</sub> isoboler samt for de blandinger, som afveg signifikant fra ADM. For blandingen diquat+mesotrion var det ikke muligt at beregne isobolerne. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre.

Målt på ED<sub>10</sub> effektniveauet var blandingerne diquat+terbuthylazin, mesotrion+terbuthylazin, glyphosat+terbuthylazin og mechlorprop+terbuthylazin antagonistiske (Figur 10), dvs. 5 af 16 blandinger afveg signifikant fra ADM. Anvendes den øvre p-værdi var ingen af isobolerne signifikant forskellige fra ADM isobolerne. Som tilfældet var på ED<sub>50</sub> effektniveauet udviste blandingen diquat+mesotrion så høj et niveau af antagonisme, at det ikke var muligt at estimere isobolen. Det er bemærkelsesværdigt, at blandingen mesotrion+terbuthylazin var antagonistisk på 10% effektniveauet, mens den samme blanding blev fundet at være synergistisk på 50% effektniveauet. En medvirkende årsag til denne forskel var, at hældningen af doseringskurverne for de to herbicider var markant forskellige, idet doseringskurven for terbuthylazin var betydelig fladere end doseringskurven for mesotrion.



Figur 10. Estimerede ED<sub>10</sub> isoboler for de blandinger, som afveg signifikant fra ADM. For blandingen diquat+mesotrion var det ikke muligt at beregne isobolerne. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre.

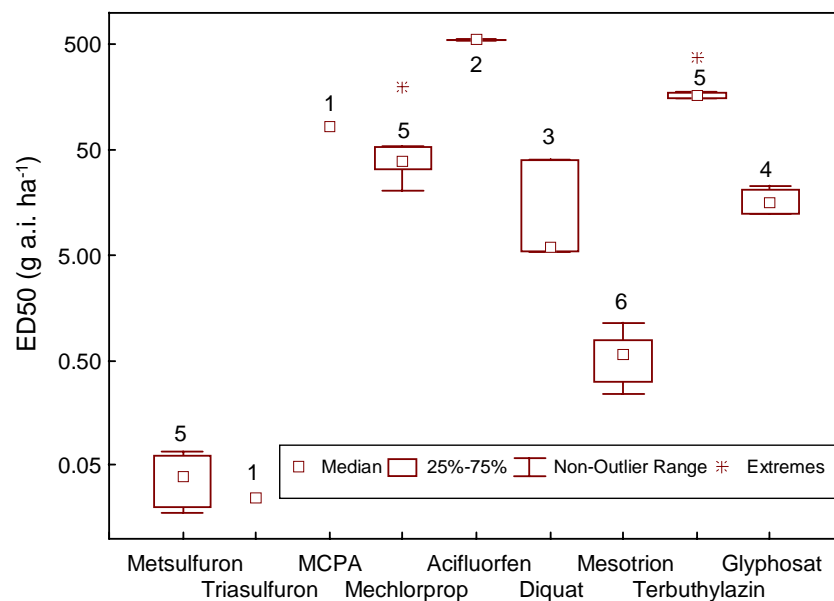
Da man med to-trins modellen ikke kan beregne en eksakt p-værdi men i stedet får angivet et interval, skal ovenstående konklusioner tages med forbehold. En nedre signifikant p-værdi bør kun tolkes som en indikation på signifikante afvigelser fra ADM. En mere rigoristisk vurdering af de opnåede resultater kunne være, at kun i de tilfælde, hvor der både på 10 og 50% effektniveauet er observeret signifikante afvigelser fra ADM, vurderes resultatet at være valid. Anlægger man denne betragtning er det kun blandingerne mesotrion+terbutylazin og glyphosat+terbutylazin samt sandsynligvis diquat+mesotrion, som er signifikante forskellige fra ADM, idet alle 3 blandinger var antagonistiske (Tabel 13).

De herbicidblandinger, som afveg signifikant fra ADM på både 10 og 50% effektniveauet tilhørte gruppen af herbicider med samme virkemåde (diquat+mesotrion og mesotrion+terbutylazin) og forskellige virkemåder (glyphosat+terbutylazin).

### 5.1.2 Alm. fuglegræs

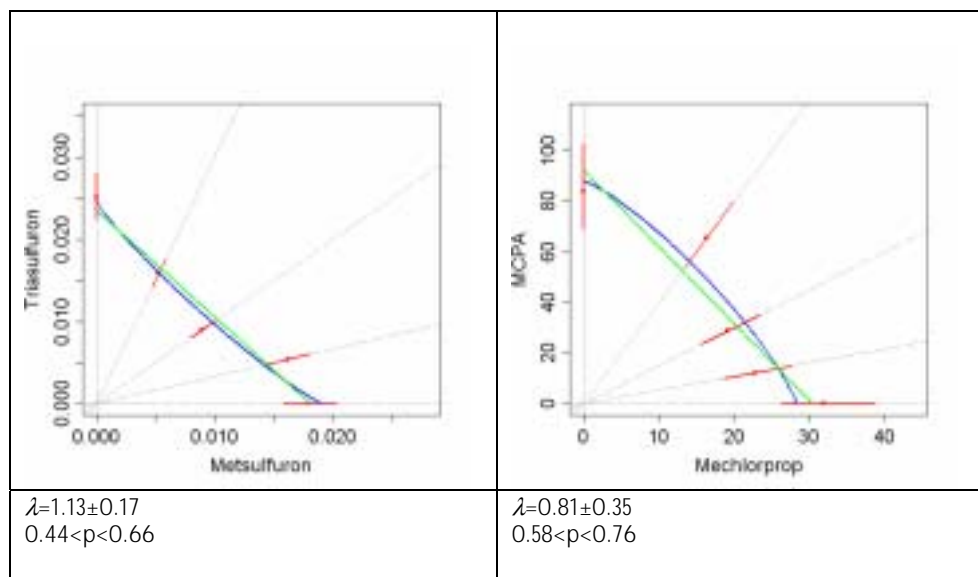
I Appendiks 2 er vist samtlige resultater med tokomponent blandinger på alm. fuglegræs. Det var ikke muligt at estimere doseringskurver for blandingen acifluorfen+terbuthylazin. Ligeledes var ikke muligt at estimere ED<sub>10</sub> doseringer for blandingen acifluorfen+diquat, og derfor er kun ED<sub>50</sub> isobolen vist i Appendiks 2.

Som tilfældet var på lugtløs kamille var metsulfuron og triasulfuron de mest toksiske af de undersøgte herbicider, mens acifluorfen og terbuthylazin var mindst toksiske (Figur 11). Forskellene imellem de mest og mindst toksiske herbicider var mere udtalt over for alm. fuglegræs end lugtløs kamille, idet triasulfuron var ca. 10.000 mere toksisk end acifluorfen. Rangordningen af herbiciderne var imidlertid næsten den samme på de to terrestriske plantearter.



Figur 11. Box-Wiskers plot af ED<sub>50</sub> værdier af de 8 pesticider anvendt i forsøgene med alm. fuglegræs. Tallene i figuren angiver antallet af uafhængige test.

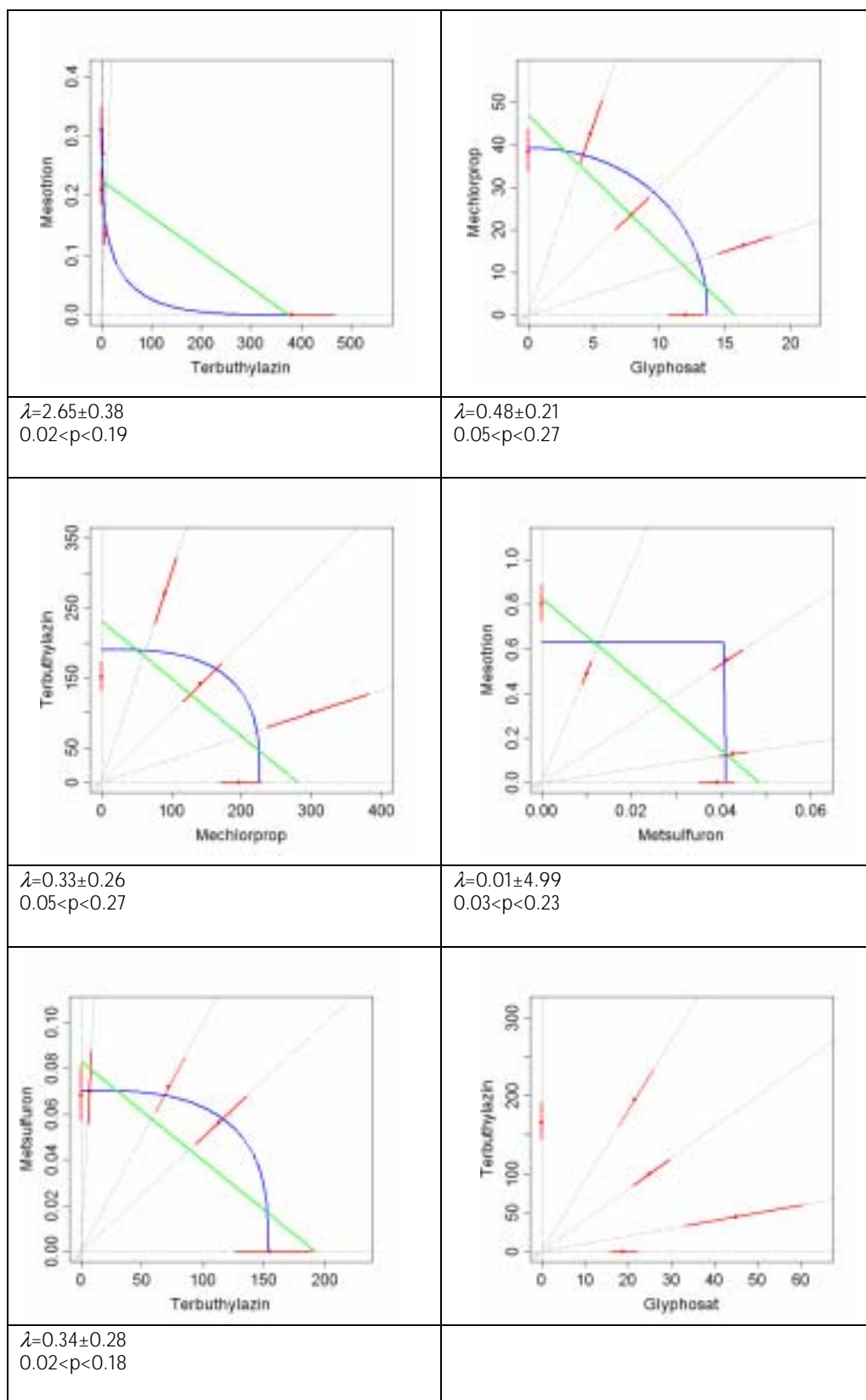
Som for lugtløs kamille var det kun med blandingerne metsulfuron+triasulfuron og mechlprop+MCPA, at hypotesen om ens hældninger af doseringskurver kunne antages. Resultaterne med begge disse blandinger afveg meget lidt fra ADM isobolen (Figur 12).



Figur 12. Estimerede ED<sub>50</sub> isoboler samt for blandingerne metsulfuron+triasulfuron og mechlorprop+MCPA. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre.

På ED<sub>50</sub> niveauet er der med udgangspunkt i den nedre p-værdi observeret signifikante afvigelser fra ADM med 5 blandinger: mesotrion+terbuthylazin, glyphosat+mechlorprop, mechlorprop+terbuthylazin, metsulfuron+mesotrion samt metsulfuron+terbuthylazin (Figur 13). Med den øvre p-værdi som reference er der ikke observeret afvigelser fra aditivitet. Med blandingen mesotrion+terbuthylazin er der tale om synergisme, mens de 4 øvrige blandinger alle udviser antagonisme. Med blandingen glyphosat+terbuthylazin er der observeret en markant antagonistisk vekselvirkning, men det var ikke muligt at estimere isobolen og dermed teste hypotesen om afvigelse fra ADM (Figur 13).

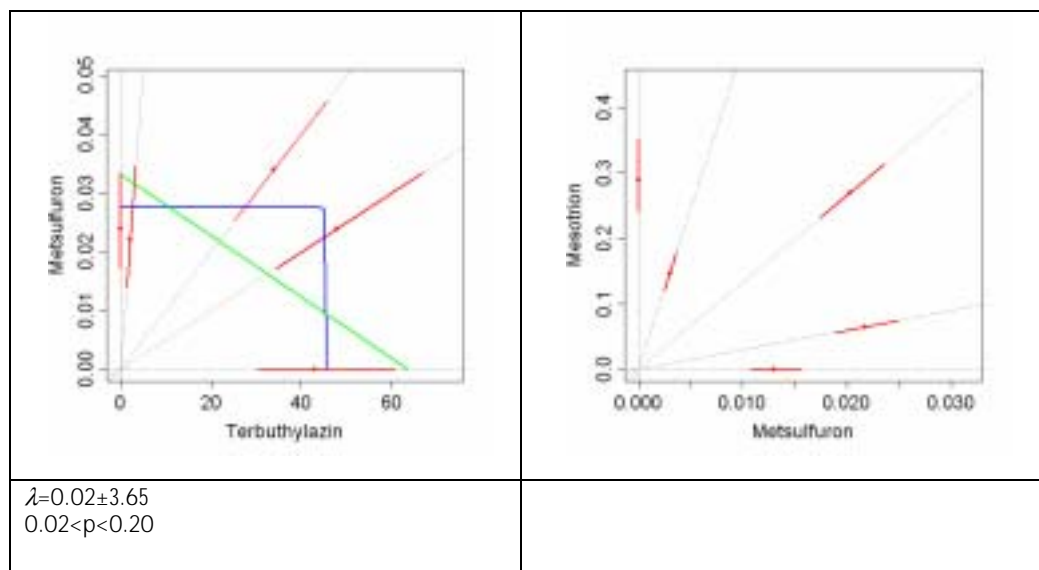




Figur 13. Estimerede ED<sub>50</sub> isoboler for de blandingerne som afveg signifikant fra ADM. For blandingen glyphosat+terbutylazin var det ikke muligt at beregne isobolerne. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre.

I modsætning til ED<sub>50</sub> niveauer er der på ED<sub>10</sub> niveauet kun i et tilfælde fundet signifikante afvigelser fra ADM, og det var med blandingen

metsulfuron+terbuthylazin. Mesotrion+metsulfuron udviser antagonisme, men det var ikke muligt at estimere isobolen og dermed verificere denne antagelse (Figur 14).



Figur 14. Estimerede ED<sub>10</sub> isoboler for de blandinger, som afveg signifikant fra ADM. For blandingen mesotrion+metsulfuron var det ikke muligt at beregne isobolerne. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre.

Anlægges samme kriterium som for lugtløs kamille, at der både på ED<sub>50</sub> og ED<sub>10</sub> niveauet skal være påvist signifikante afvigelser fra ADM, før disse afvigelse kan tillægges nogen vægt, så afviger kun blandingen metsulfuron+terbuthylazin samt mesotrion+metsulfuron, såfremt de markante men ikke statistisk verificerede afvigelser fra ADM på ED<sub>10</sub> niveauet med denne blanding medtages. Det betyder, at der er tale om andre blandinger end for lugtløs kamille, og at begge blandinger er karakteriseret ved, at der er tale om herbicider med forskellige virkemåder.

I tabel 14 er resultaterne på terrestriske planter sammenstillet. Sammenfattende kan det konkluderes, at de fleste blandinger ikke afveg signifikant fra ADM, men at der på begge testplanter er observeret enkelte eksempler på antagonisme. Derimod blev der kun observeret synergisme i meget få tilfælde, og altid kun ved et af de to undersøgte effektive niveauer, og forsøgene har således vist, at synergi er sjældent, når terrestriske planter eksponeres for blandinger af to herbicider.

Tabel 14. Virkning af tokomponent blandinger på terrestriske planter (lugtløs kamille/alm. fuglegræs). A = additiv virkning; AN = antagonistisk virkning.

	Metsulfuron/ Triasulfuron	Glyphos at	Mechlorprop/ MCPA	Terbuthylazin	Diquat	Acifluorfen
Metsulfuron	A/A	A/A				
Glyphosat	A/A					
Mechlorprop	A/A	A/A	A/A			
Terbuthylazin	A/AN	AN/A	A/A			
Diquat				A/A		
Acifluorfen				A/A	A/A	
Mesotrion	A/AN	A/A	A/A	A/A	AN/A	A/A

### 5.1.3 Afrunding

Antallet af publikationer omhandlende effekten af blandinger af herbicider over for terrestriske planter er meget stort, som følge af at herbicider er den gruppe pesticider, hvor der i praksis oftest anvendes mere end et aktivstof ad gangen. Blandt de mange publikationer er der imidlertid kun et fåtal, som har haft til formål at beskrive effekterne statistisk, og i de fleste af disse undersøgelser er der anvendt andre statistiske metoder end i nærværende projekt (se Hatzios & Penner, 1985). Ofte er der anvendt den såkaldte Colby metode, som er en forenklet version af MSM metoden, idet kombinationseffekterne som oftest vurderes på baggrund af resultaterne med blot en enkelt dosering af hvert herbicid og herbicidblandingen (Colby, 1967). Det er derfor ikke muligt at sammenholde disse resultater med resultaterne fra dette projekt.

ADM metoden er tidligere brugt til at undersøge effekten af blandinger af herbicider med auxin virkning (Streibig, 1987; Streibig et al, 1998), chlorsulfuron og linuron (Streibig, 1983), MCPA og sulfonylurea herbicider (Mathiassen & Kudsk, 1993), tribenuron og henholdsvis ioxynil+bromoxynil og mechlorprop (Kudsk & Mathiassen 1995), naturlige og syntetiske photosystem II inhibitorer (Streibig et al., 1999) samt herbicider, som påvirker aminosyresyntesen (Kudsk & Mathiassen, 2004). For samtlige disse undersøgelser, som kun omfatter en begrænset antal virkemåder, er der med en enkelt undtagelse enten fundet additivitet eller antagonisme. Resultaterne fra tidligere undersøgelser er altså sammenfaldende med konklusionerne fra dette projekt, men herbiciderne, der er undersøgt i dette projekt, repræsenterer imidlertid mange flere virkemåder.

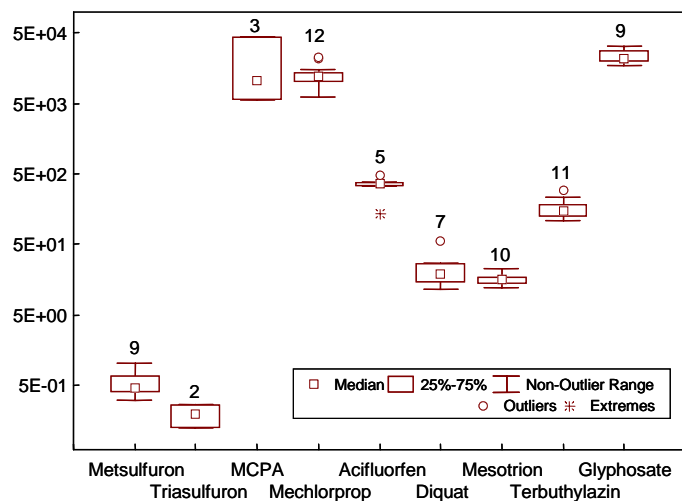
Med baggrund i i resultaterne fra dette projekt samt tidligere undersøgelser, kan det konkluderes, at tokomponent blandinger af herbicider som hovedregel udviser additivitet eller antagonisme, og at synergisme er et fænomen, som ses meget sjældent.

## 5.2 Akvatiske planter

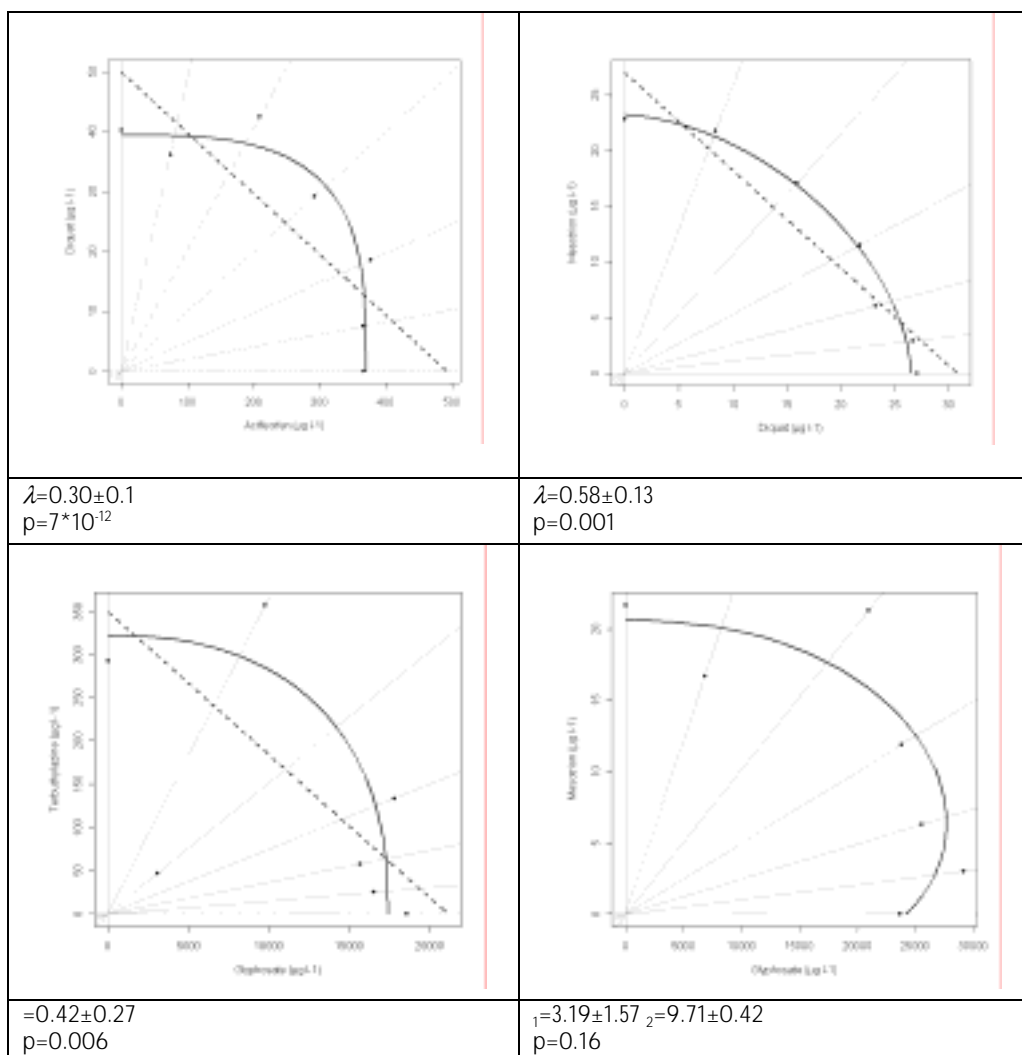
De forskellige herbiciders toksicitet overfor *Lemna minor* varierede med mere end en faktor 100 000. Triasulfuron var det mest toksiske med en gennemsnitlig  $EC_{50}$  værdi på  $0,19 \pm 0,10 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 2$ ) hvorimod glyphosats  $EC_{50}$  lå på  $23316 \pm 5165 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 9$ ) (Figur 15).

I Appendiks 3 er vist samtlige resultater med tokomponent blandinger på *Lemna minor*.  $EC_{50}$  isobolerne er beregnet med et-trins modellen, mens  $EC_{10}$  isobolerne er beregnet vha. to-trins modellen. Isobolen for glyphosat+mesotrion udviste en meget voldsom antagonisme, og denne isobols forløb var derfor bedre beskrevet med Vølunds model. I denne model er afvigelse fra additivitet beskrevet med de to parametre  $\alpha_1$  og  $\alpha_2$ . Vølunds model er kun anvendt på  $EC_{50}$  isobolerne.

Estimeringen af doseringskurverne viste, at for 3 af de 17 kombinationer (glyphosat+mechlorprop, mechlorprop+terbuthylazin og glyphosat+mesotrion) var hældningerne af doseringskurverne inden for det enkelte forsøg ikke signifikant forskellige fra hinanden. Dvs. at det kun er for disse tre herbicidkombinationer, at interaktionerne på  $EC_{50}$  niveau umiddelbart kan ekstrapoleres til andre effektive niveauer.

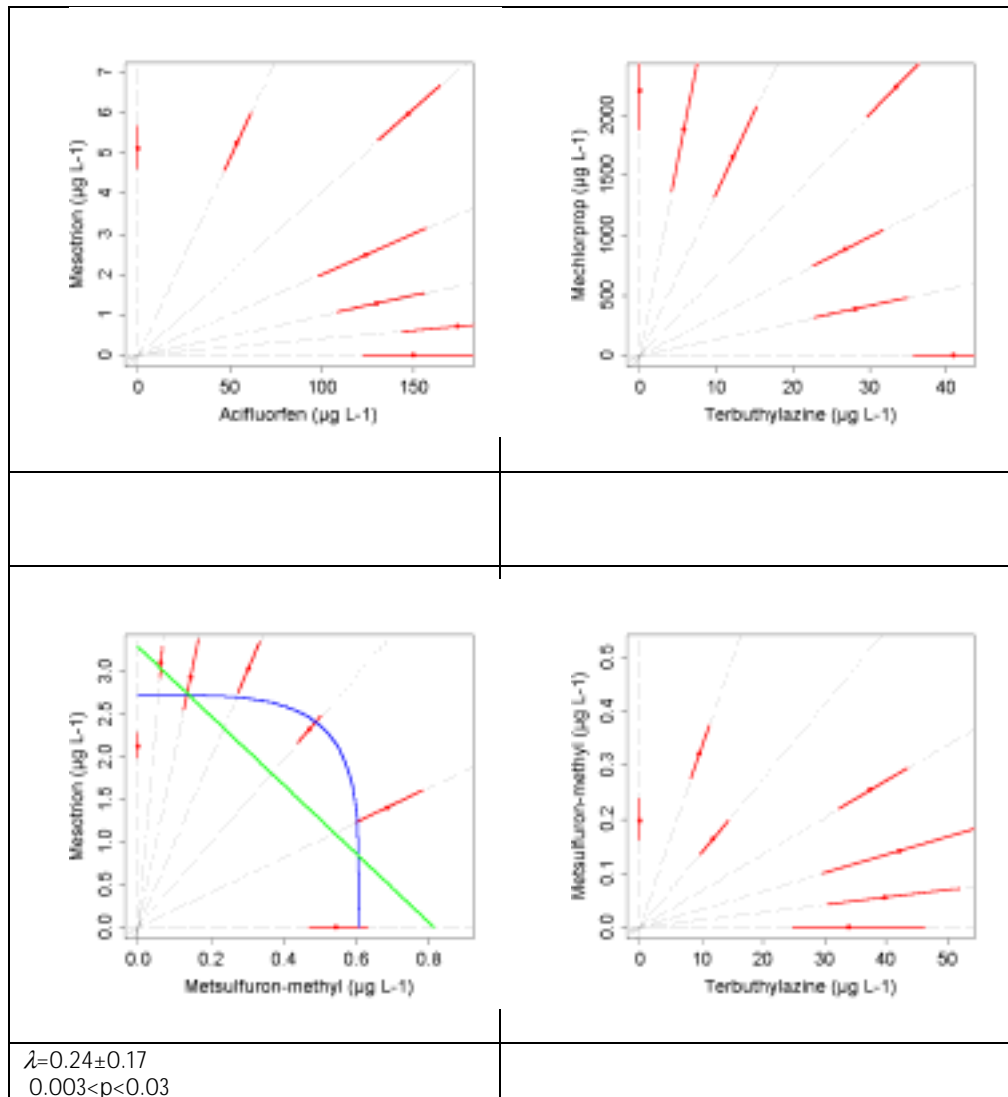


Figur 15. Box-Wiskers plot af  $EC_{50}$  værdierne for de forskellige herbicider anvendt i forsøgene med *Lemna minor*. Rækkefølgen på herbiciderne er alfabetisk: 1. Acifluorfen ( $n = 5$ ), 2. Diquat ( $n = 7$ ), 3. Glyphosate ( $n = 9$ ), 4. MCPA ( $n = 3$ ), 5. Mechlorprop ( $n = 12$ ), 6. Mesotrion ( $n = 10$ ), 7. Metsulfuron ( $n = 9$ ), 8. Terbutylazin ( $n = 12$ ), 9. Triasulfuron ( $n = 2$ ).



Figur 16. Eksempler på estimerede  $ED_{50}$  isoboler for blandingerne, som afveg signifikant fra ADM. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre.

De statistiske analyser af  $EC_{50}$  isobolerne viste, at der var antagonisme for 11 ud af de 17 herbicidkombinationer. For de resterende kombinationer var der additivitet. De to kombinationer af herbicider med samme virkningsmekanisme, de to sulfonylurea herbicider metsulfuron og triasulfuron og de to syntetiske auxiner MCPA og mechlorprop udviste begge additivitet. I figur 16 er vist eksempler på herbicidkombinationer, som udviste antagonisme.



Figur 17. Estimerede  $ED_{10}$  isoboler for blandingerne, som afveg signifikant fra ADM. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre.

Et tilsvarende mønster viste sig, når analyserne blev foretaget ved  $EC_{10}$ . Afgivelserne fra den additive model for  $EC_{10}$  var dog kun signifikante for 4 af de 17 kurver, når man tæller de 3 kurver med kraftig antagonisme med (acifluorfen+mesotrion, mechlorprop+terbutylazin og metsulfuron+terbutylazin) (Figur 17). Anvendes kun den laveste p-værdi i intervallet, er yderligere 4 kurver forskellig fra additivitet. Af disse udviser to antagonisme på  $EC_{10}$  niveau, hvorimod deres  $EC_{50}$  isoboler ikke var signifikant forskellige fra den additive model. Da der i to-trins modellen anvendes p-intervaller, skal man være forsigtig med konkludere på disse resultater. At antagonisme var mere udbredt på  $ED_{50}$  end på  $ED_{10}$  niveauet kan delvis skyldes, at et-trins modellen, som blev anvendt til analyse af  $ED_{50}$  resultaterne er en

mindre konservativ model end to-trins modellen, som er anvendt til analyse af ED<sub>10</sub> resultaterne.

I tabel 15 er vist en sammenstilling af resultaterne, hvor der som for terrestriske planter er forudsat, at afvigelser fra additivitet kun er signifikante, såfremt de er observeret på både på 50 og 10% effektniveauet.

Tabel 15. Virkning af tokomponent blandinger på akvatiske planter. A= additiv virkning; AN= antagonistisk virkning.

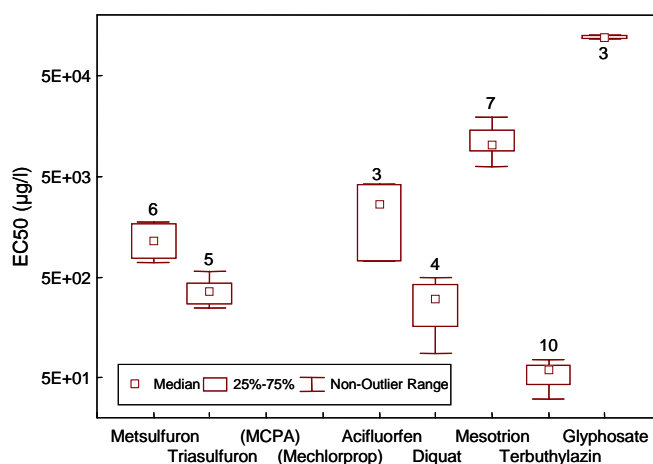
	Metsulfuron/ Triasulfuron	Glyphosat	Mechlorprop/ MCPA	Terbuthylazin	Diquat	Acifluorfen
Metsulfuron	A					
Glyphosat	A					
Mechlorprop	A	A	A			
Terbuthylazin	AN	A	AN			
Diquat				A		
Acifluorfen				A	A	
Mesotrion	AN	A	AN	A	AN	AN

### 5.2.1 Afrunding

Der er blevet lavet meget få studier med blandingseffekter på *Lemna sp.* eller andre højere vandplanter (Drost et al., 2003, Frankart et al., 2002), og ingen (udover os (Cedergreen & Streibig, 2005)), har anvendt isobolmetoden. Der er i stedet blevet anvendt enkelte fikserede blandingsforhold, som man har ment har været miljømæssigt relevante. I begge studier har man fundet overensstemmelse mellem resultaterne og den additive model (Drost et al., 2003; Frankart et al., 2002). Dette stemmer godt overens med den overordnede konklusion på de binære *Lemna minor* forsøg i dette projekt, hvor der ikke blev observeret synergistiske interaktioner med de undersøgte herbicidkombinationer. I forsøgene i dette projekt var der tværtimod antagonisme for de fleste kombinationer, i nogle tilfælde endda meget kraftig antagonisme.

### 5.3 Alger

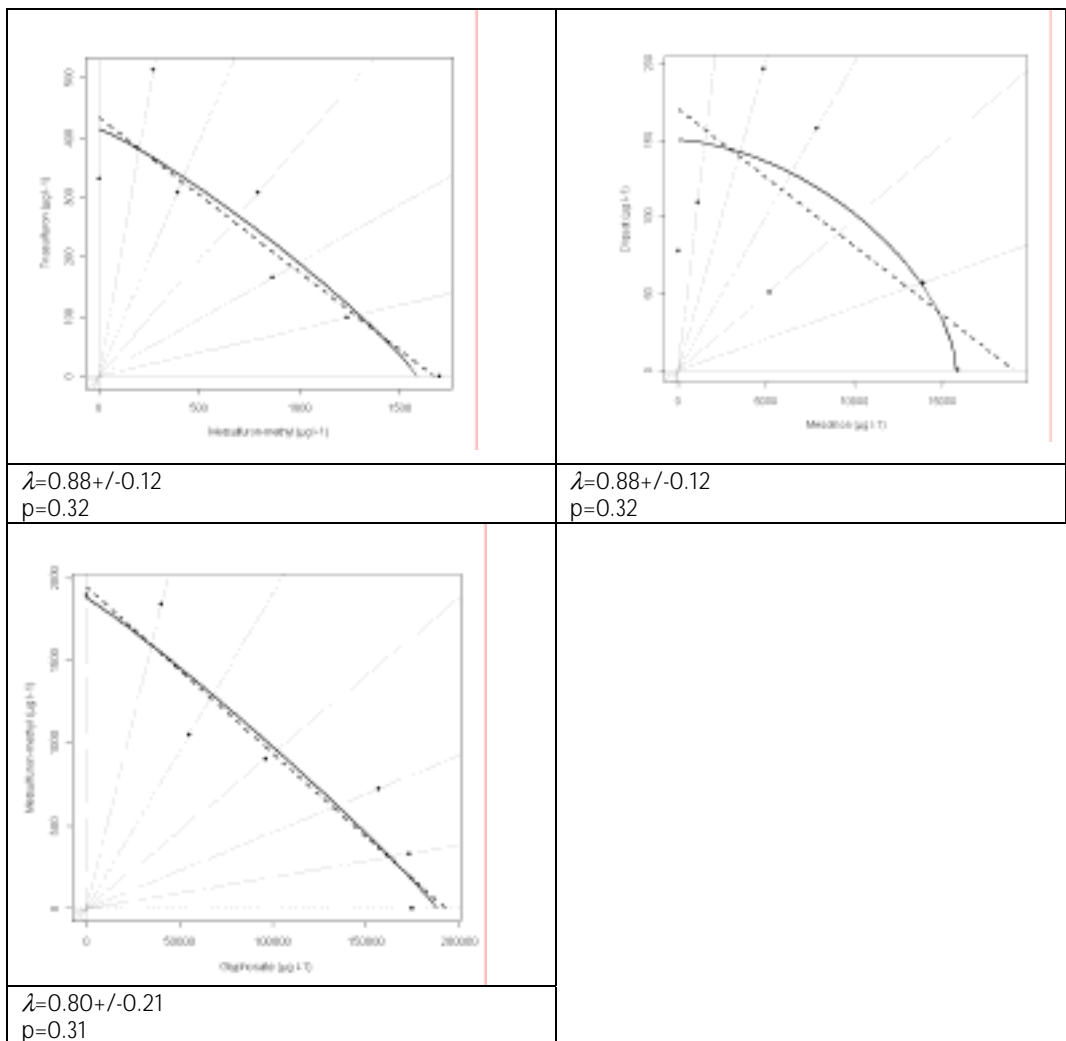
EC<sub>50</sub> værdierne for de 7 herbicider, der er undersøgt på alger, er vist i figur 18. Rækkefølgen på herbiciderne er den samme som for *Lemna*. Det bør bemærkes at for de svage syrer som mesotrion, metsulfuron-methyl og triasulfuron, skulle der næsten 100 gange højere koncentration til at udløse den samme væksthæmmende effekt sammenlignet med *Lemna minor*.



Figur 18. Box-Wiskers plot af  $EC_{50}$  værdierne for de forskellige herbicider anvendt i forsøgene med algen *P. subcapitata*. Rækkefølgen på herbiciderne er alfabetisk: 1. Acifluorfen ( $n = 3$ ), 2. Diquat ( $n = 4$ ), 3. Glyphosate ( $n = 3$ ), 4. MCPA ( $n = 0$ ), 5. Mechlorprop ( $n = 0$ ), 6. Mesotrion ( $n = 7$ ), 7. Metsulfuron ( $n = 6$ ), 8. Terbuthylazin ( $n = 10$ ), 9. Triasulfuron ( $n = 5$ ).

Beregningerne af doseringskurverne viste, at for 5 af de 12 kombinationer (metsulfuron+triasulfuron, glyphosat+metsulfuron, glyphosat+terbuthylazin, acifluorfen+diquat samt acifluorfen+mesotrion) var hældningerne af doseringskurverne inden for det enkelte forsøg ikke signifikant forskellige. Alle 3 typer af tokomponent blandinger er repræsenteret blandt de 5 blandinger.

Resultaterne med tokomponent blandinger på alger er vist i Appendiks 4. Resultaterne fra disse forsøg lignede meget forsøgene med *Lemna minor*, idet der heller ikke her blev fundet synergi men udelukkende antagonisme og additivitet. På  $EC_{50}$  niveau var 9 ud af 12 binære kombinationer signifikant antagonistiske (Figur 19). De 3 blandinger, der udviste additivitet, var metsulfuron+triasulfuron, diquat+mesotrion og metsulfuron+glyphosat, dvs. en blanding med samme virkningsmekanisme, en blanding med samme virkemåde samt en blanding med forskellige virkemåder.



Figur 19. Estimerede ED<sub>50</sub> isoboler for blandingerne, som udviste additivitet. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre.

For blandingen metsulfuron versus terbuthylazin har vi valgt at vise resultaterne fra to forsøg, da det ene forsøg var signifikant antagonistisk, mens det andet forsøg ikke var.

For EC<sub>10</sub> isobolerne var fire af de tolv kurver signifikant forskellige fra den additive model. Tre af disse kurver viste så kraftig antagonisme, at de ikke kunne beskrives med Hewlett og Placketts isobolmodel (Hewlett, 1969).

I tabel 16 er vist en sammenstilling af resultaterne, hvor der som for terrestriske og akvatiske planter er forudsat, at afvigelser fra additivitet kun er signifikante, såfremt de er observeret på både på 50 og 10% effektniveauet.

Tabel 16. Virkning af tokomponent blandinger på alger. A = additiv virkning; AN= antagonistisk virkning.

	Metsulfuron/ Triasulfuron	Glyphosat	Terbuthylazin	Diquat	Acifluorfen
Metsulfuron	A				
Glyphosat	A				
Terbuthylazin	A	AN			
Diquat			AN		
Acifluorfen			A	AN	
Mesotrion	A	A	A	A	A



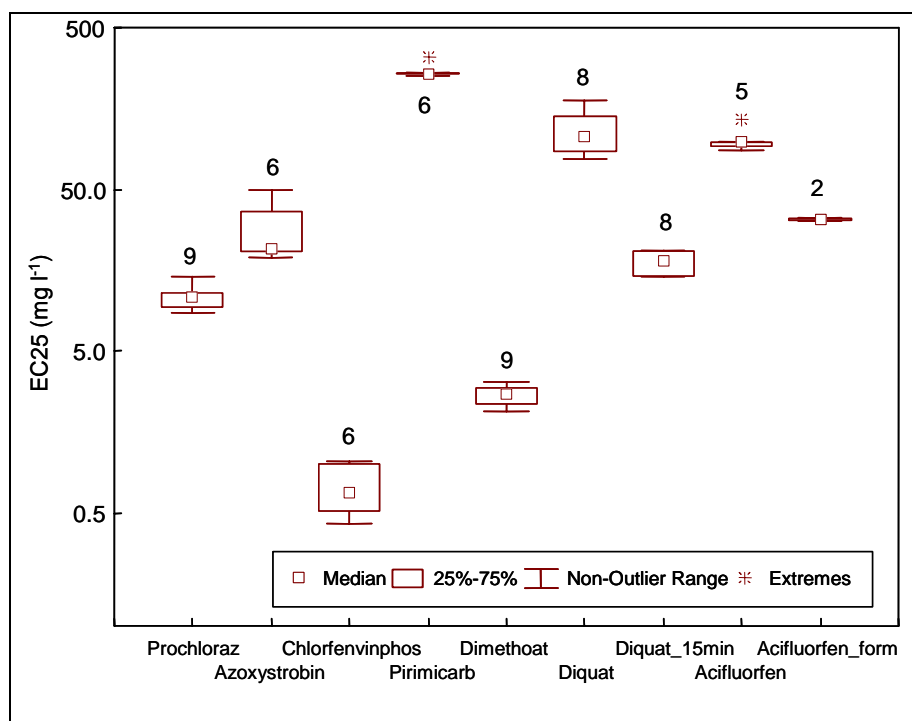
### 5.3.1 Afrunding

Der er publiceret adskillige forsøg med kombinationseffekter på alger (Faust et al., 2003, Faust et al., 2001, Junghans et al., 2003, Vanwijk et al., 1994). Dette skyldes dels, at alger er en af de standard testorganismer, som er obligatorisk for risikovurdering af en række kemikalier. De mest omfattende studier er blevet udført af Horst Grimmes forskningsgruppe i Bremen. De har i forbindelse med et større EU-projekt (BEAM) analyseret 146 binære kombinationer af diverse kemikalier på alger vha. isobolmetoden (Backhaus et al., 2003, Faust & Scholze, 2004; Grimme & Backhaus, 2003). Denne gruppe har, i lighed med os, fundet, at der sjældent var synergistiske interaktioner i algetesten (Faust et al., 2004). Og når disse blev fundet, var de så små, at man kunne se bort fra dem i en risikoreguleringsmæssig sammenhæng (Faust et al., 2004).

### 5.4 Akvatiske bakterier

Som følge af, at isobolerne baseret på henholdsvis  $EC_{25}$  og  $EC_{50}$  koncentrationerne var stort set identiske, er kun  $EC_{50}$  isobolerne for Microtox testene vist.

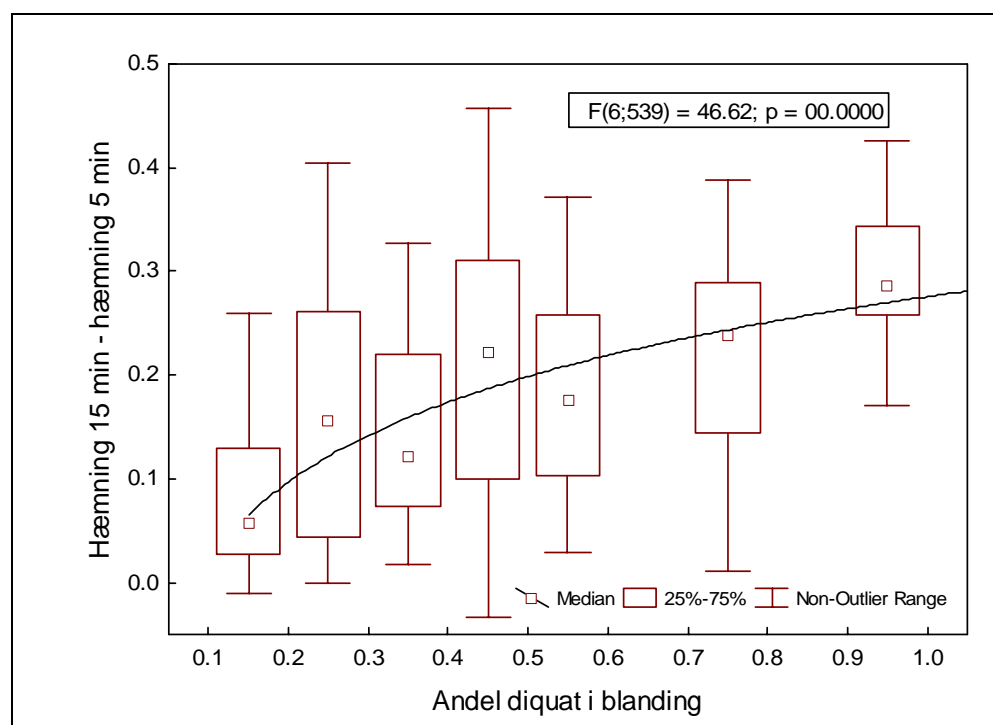
Toksiciteten af enkeltstoffer i Microtox testen varierede betydeligt mellem pesticiderne, med chlorfenvinphos som det mest ( $EC_{50} = 5.5 \pm 0.9 \text{ mg l}^{-1}$ ) og pirimicarb som det mindst ( $EC_{50} = 688 \pm 82 \text{ mg l}^{-1}$ ) toksiske (Figur 20). Acifluorfen blev testet dels som rent stof og dels som formuleret produkt, og som forventeligt var effekten af det formulerede produkt væsentligt højere ( $EC_{50} = 72,5 \text{ mg l}^{-1}$ ) end for det rene stof ( $EC_{50} = 244 \text{ mg l}^{-1}$ ).



Figur 20. Box-Wiskers plot af  $EC_{50}$  værdier af 7 pesticider anvendt forsøg med to- og trekomponent blandingforsøg med Microtox. Tal lene i figuren angiver antal let af uafhængige test.

Indenfor det enkelte pesticid var variationen i effektkoncentrationen generelt lav og uafhængig af eksponeringstiden (5, 15 og 30 min). Diquat og delvist

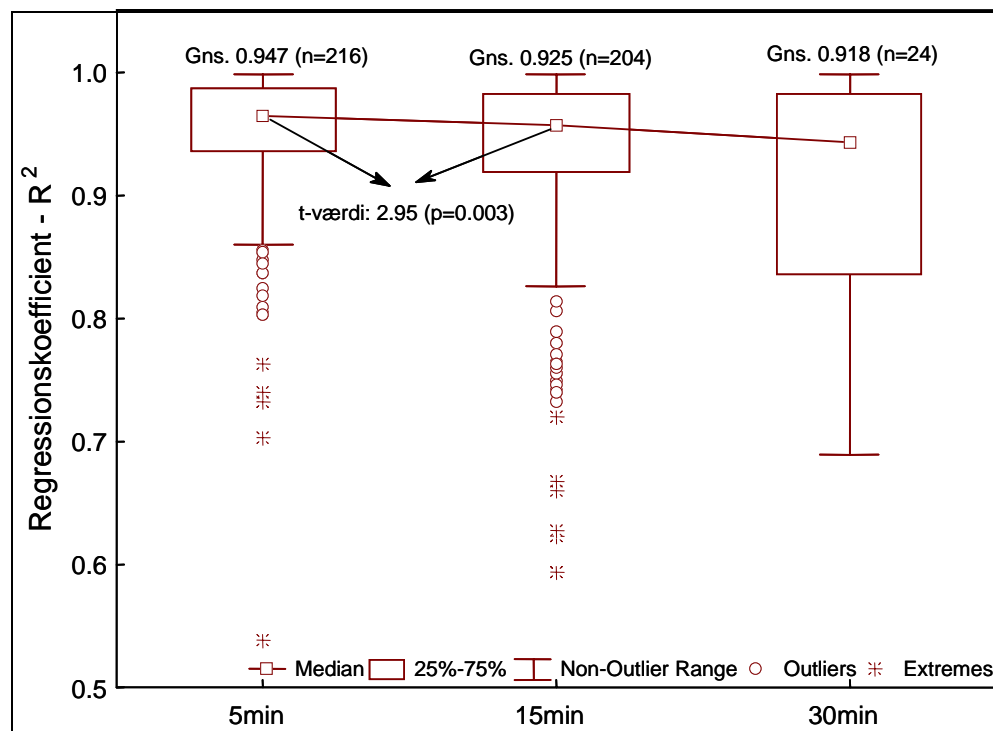
acifluorfen udgjorde dog en undtagelse med aftagende EC-værdier ved øget eksponeringsvarighed (for diquat var  $EC_{50}$  værdierne henholdsvis 5 min: 261  $mg\ l^{-1}$ ; 15 min: 52  $mg\ l^{-1}$ ; 30 min: 39  $mg\ l^{-1}$ ). Denne egenskab ved diquat gik igen i blandingsforsøgene, idet den tidlige ændring i luminescenhæmningen øgedes med diquats andel i blandingerne (Figur 21).



Figur 21. Differens i hæmning af luminescens efter 15 og 5 min eksponering som funktion af diquats andel i pesticidblanding. Y-værdien udtrykker differencen af Arctan-transformerede %-hæmninger. F statistik angivet.

En øget hæmning af luminescens med stigende inkubationstiden er karakteristisk for tungmetaller, mens effekten er mindre almindelig for organiske stoffer (Azur 2003).

I Microtox forsøgene blev der beregnet mere end 400 doseringskurver. Anvendes korrelationskoefficienten som udtryk for kurvetilpasningen (logit) og variationen indenfor det enkelte forsøg, var variationen mindst efter 5 min aflæsning og stigende med varighed af eksponering (Figur 22). Anvendelse af regressionsligninger baseret på 5 min eksponering til beregning af effektkoncentrationer må derfor anses som mest velegnede til sammenligning af EC-værdier i blandingsforsøg.

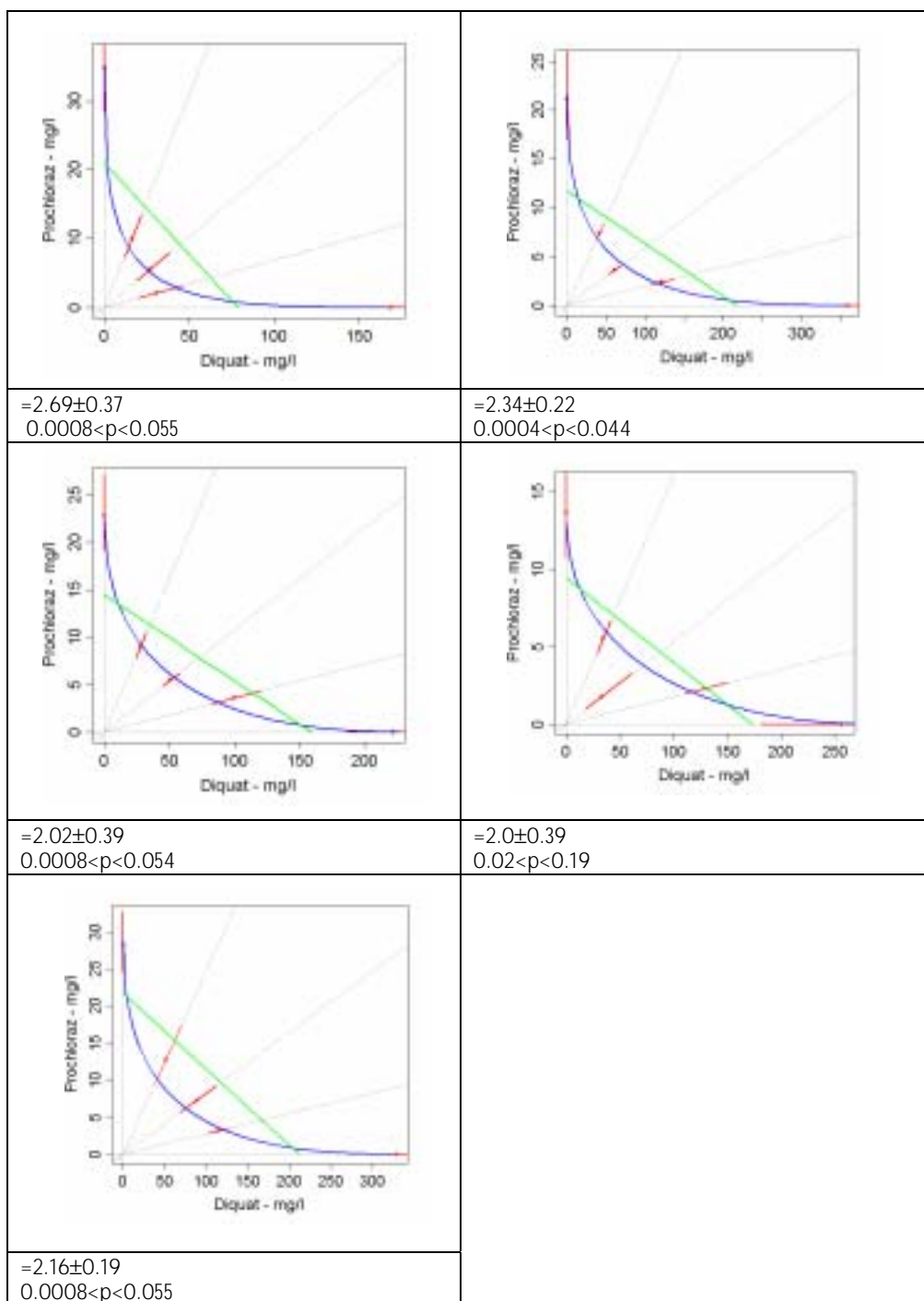


Figur 22. Median og konfidensinterval af regressionskoefficienter i logit doseringsmodel er udviklet på basis af luminescenshæmninger efter 5, 15 og 30 min eksponering. t-test værdi og signifikansniveau for forskel i middelværdi mellem hæmning efter 5 og 15 min angivet.

I blandingsforsøgene er de samme kombinationer af 2 pesticider undersøgt i flere uafhængige test (se tabel 6 og 7). Eksempler på isoboldiagrammer for forsøg med blandinger af diquat-prochloraz er vist i figur 23. I dette eksempel og for de øvrige blandinger, hvor der er gennemført flere test, var der god overensstemmelse mellem resultaterne i de enkelte test. I Appendiks 5, hvor resultater med samtlige tokomponentblandinger er vist, er derfor kun medtaget resultater fra et forsøg med hver tokomponentblanding.

For 5 af de 17 tokomponentblandinger er påvist synergisme, for 7 blandinger var virkningen additiv, mens det ikke kunne afgøres om der var tale om synergisme eller en additiv virkning i 4 blandinger enten pga. forskelligt udfald i de enkelte test, eller fordi der kun forelå én test med usikkert udfald (dimethoat+pirimicarb) (Tabel 17). Med en enkelt blanding var det ikke muligt at afgøre, om der var tale om additivitet eller antagonisme. Det vil sige, at der i modsætning til forsøgene med terrestriske og akvatiske planter samt alger med en enkelt undtagelse ikke er observeret antagonisme.

Et generel mønster var, at virkningen af tokomponent blandinger, hvor pirimicarb eller azoxystrobin indgik, overvejende var additiv. I blandinger med azoxystrobin var standardafvigelsen på  $EC_{50}$ -værdierne dog meget store, hvilket var en medvirkende årsag til dette resultat. I blandinger med prochloraz var der synergisme i 3 ud af 6 blandinger og hvor der var synergistisk virkning var denne generelt meget tydelig.



Figur 23. Estimerede ED<sub>50</sub> isoboler for 5 uafhængige test med tokomponent blandinger af diquat og prochloraz. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre.

Tabel 17. Virkning af tokomponent blandinger på akvatiske bakterier (Microtox). A= additiv virkning; AN=antagonistisk virkning; S = synergistisk virkning.

	Chlorfenvinphos	Dimethoat	Diquat	Pirimicarb	Prochloraz
Acifluorfen	S	A	A		A-S
Azoxystrobin	A		A-AN	A	A-S
Chlorfenvinphos		A-S		A	S
Dimethoat			S	A-S	S
Diquat				A	S
Pirimicarb					A

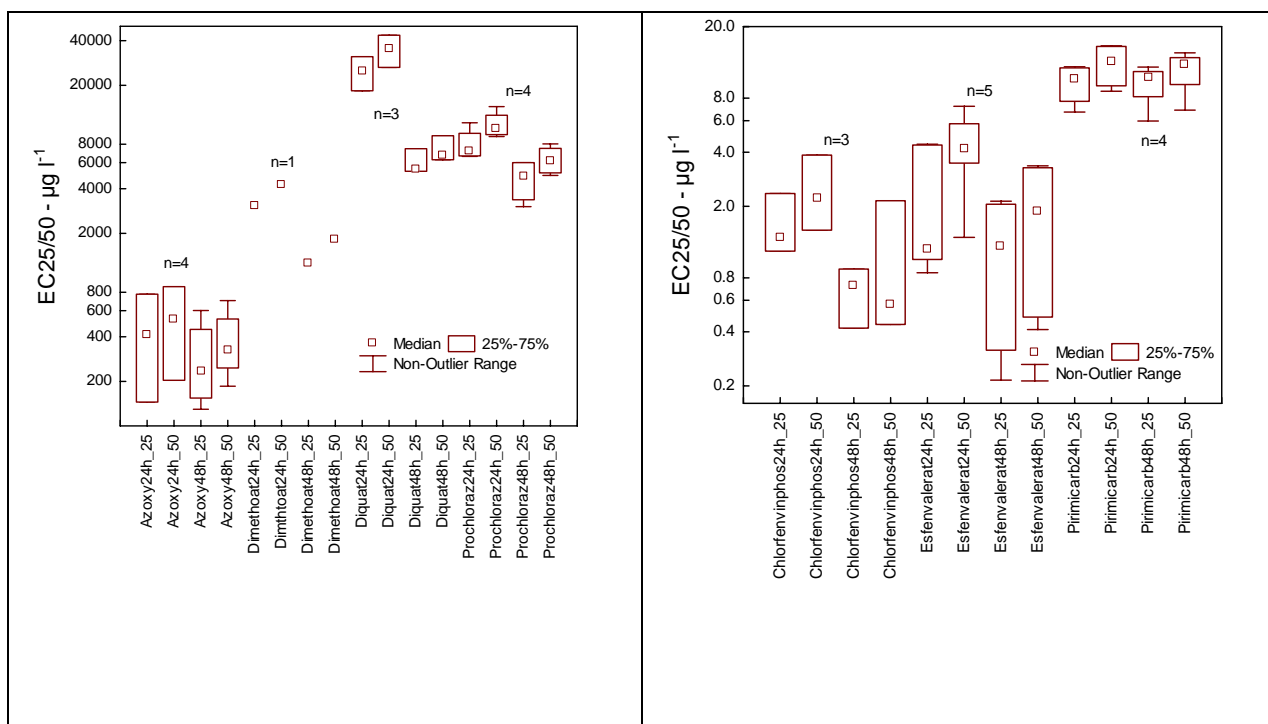
## 5.4.1 Afrunding

Microtox test er tidligere anvendt i undersøgelser af tokomponent blandingers toksicitet (Chen & Lu 2002 og tidligere referencer). I 18 blandinger blev påvist synergisme i 5 tilfælde, antagonisme i 9 tilfælde og additivitet i 4 tilfælde. Vurdering af interaktion mellem stofferne blev dog ikke baseret på egentlige test som i dette projekt. Med en enkelt undtagelse forekom synergisme, når stofferne havde forskellig virkemekanisme, og det var videre karakteristisk, at stoffer (ét eller begge), som i blanding virkede synergistisk, havde en lav hældning i doseringskurven. Dette forhold var også delvist gældende i nærværende undersøgelse, hvor prochloraz i gennemsnit havde den laveste hældning ( $1.6 \pm 0.2$ ).

## 5.5 Dafnier

Da isobolerne baseret på henholdsvis  $EC_{25}$  og  $EC_{50}$  koncentrationerne var stort set identiske, er kun  $EC_{50}$  isobolerne vist for dafnieforsøgene.

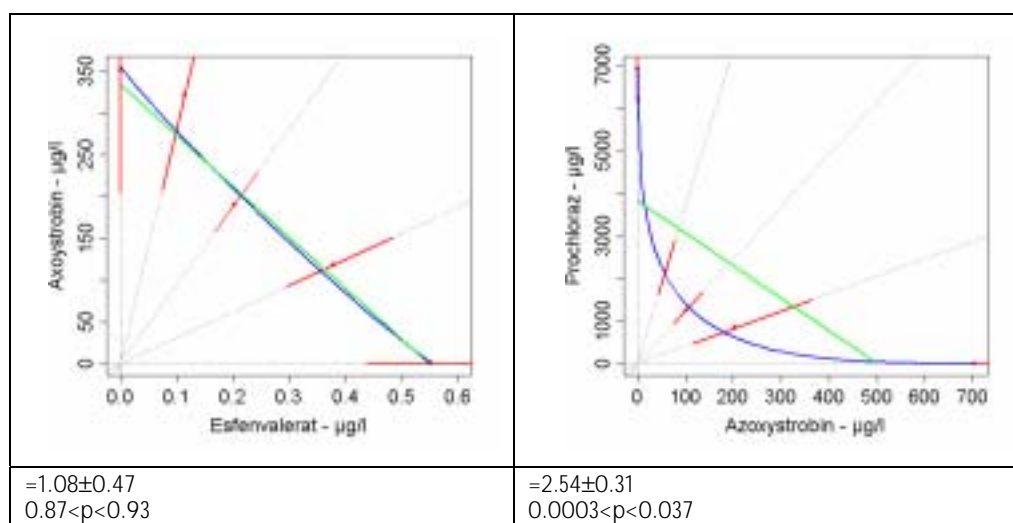
Toksiciteten af enkeltstoffer i test med dafnier varierede betydeligt mellem pesticiderne med chlorfenvinphos og esfenvalerat som de mest toksiske og diquat samt prochloraz som de mindst toksiske (Figur 24). Indenfor det enkelte pesticid reduceredes  $EC_{25}/EC_{50}$  værdierne fra 24 til 48 timers eksponering mest udpræget for diquat (3-4 gange reduktion) og mindst udpræget for pirimicarb.



Figur 24. Box-Wiskers plot af  $EC_{25}$  og  $EC_{50}$  værdier af 7 pesticider beregnet efter 24 og 48 timers eksponering. Tallene i figuren angiver antallet af uafhængige forsøg.

Ud af 12 tokomponentblandinger viste 3 blandinger synergisme, én antagelig antagonisme, mens 8 blandinger viste additiv virkning (Tabel 18). I figur 25 er vist et eksempel på additiv virkning og et eksempel på synergisme. I

Appendiks 6 er vist  $EC_{50}$  og  $EC_{25}$  isobolerne for alle tokomponentblandingsforsøg med dafnier. Det var karakteristisk, at i forsøgene med synergi indgik prochloraz altid, og kun i ét forsøg, hvor prochloraz indgik (i blanding med dimethoat), var der ikke synergistisk virkning (Tabel 18).



Figur 25. Estimerede  $ED_{50}$  isoboler for 2 tokomponentblandinger, som viser additiv (esfenvalerat-azoxystrobin) og synergistisk (azoxystrobin-prochloraz) virkning. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre.

Tabel 18. Virkning af pesticider i tokomponent blandinger på dafnier. A= additiv virkning; AN=antagonistisk virkning; S = synergistisk virkning.

	Chlorfenvinphos	Esfenvalerat	Pirimicarb	Prochloraz
Azoxystrobin	A-AN	A	A	S
Chlorfenvinphos		A	A	
Dimethoat				A
Diquat		A	A	S
Esfenvalerat			A	S

### 5.5.1 Afrunding

En tidligere undersøgelse af tokomponentblandinger med dafnier viste, at to stoffer med samme virkemekanisme (nonylamin + decylamin) virkede additivt, mens en blanding af to stoffer med forskellig virkemekanisme (ethylparathion + decylamin) virkede antagonistisk (Merino-Garcia et al. 2003). I undersøgelsen blev interaktion mellem stofferne vurderet på basis af isoboler, men en egentlig statistisk test blev ikke udført.

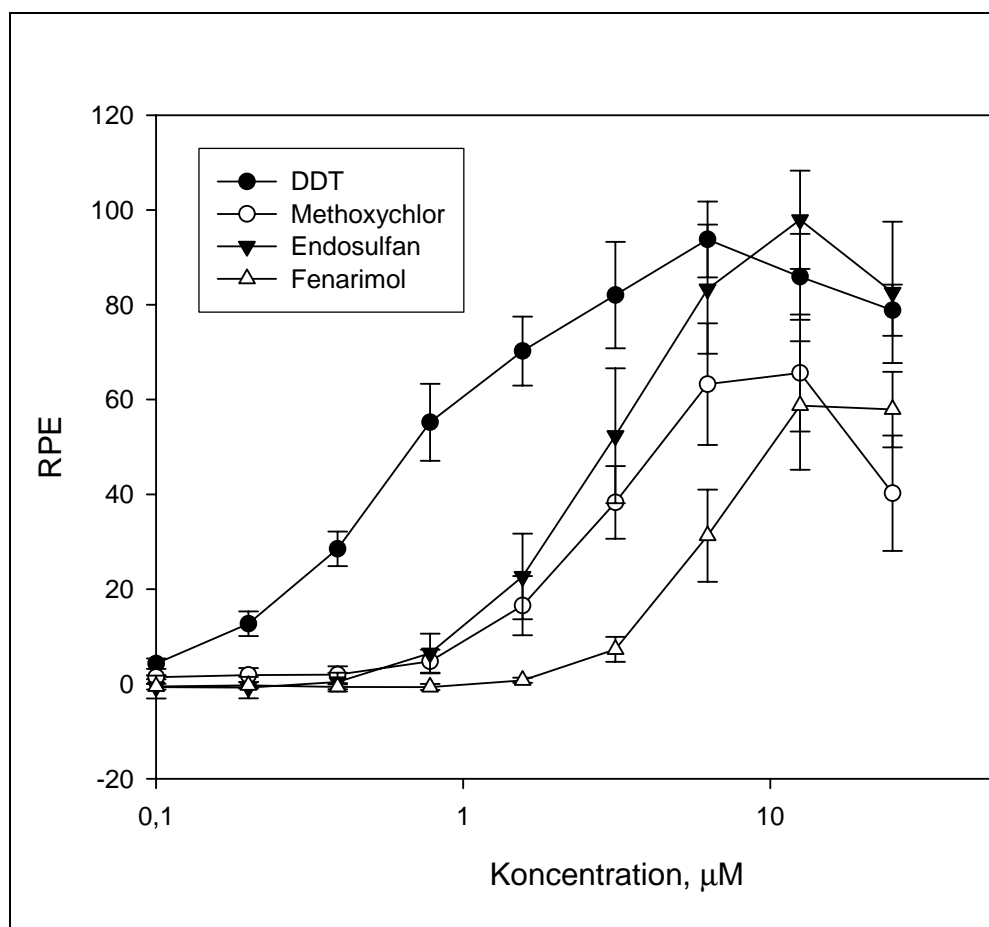
## 5.6 Hormonforstyrrende effekter

### 5.6.1 MCF7 celleproliferationsassay

Oprindeligt var det planlagt at teste 12 forskellige koncentrationer, men da den første testning af enkeltstofferne viste, at der ikke var respons under 0,1  $\mu$ M, og at der var udpræget cytotoxicitet ved koncentrationer over 25  $\mu$ M, blev pesticidblandingerne testet i 9 forskellige koncentrationer fra 0.1 til 25  $\mu$ M. Hver koncentrationsrække indeholdt desuden kontroller, som ikke blev eksponeret for pesticid.

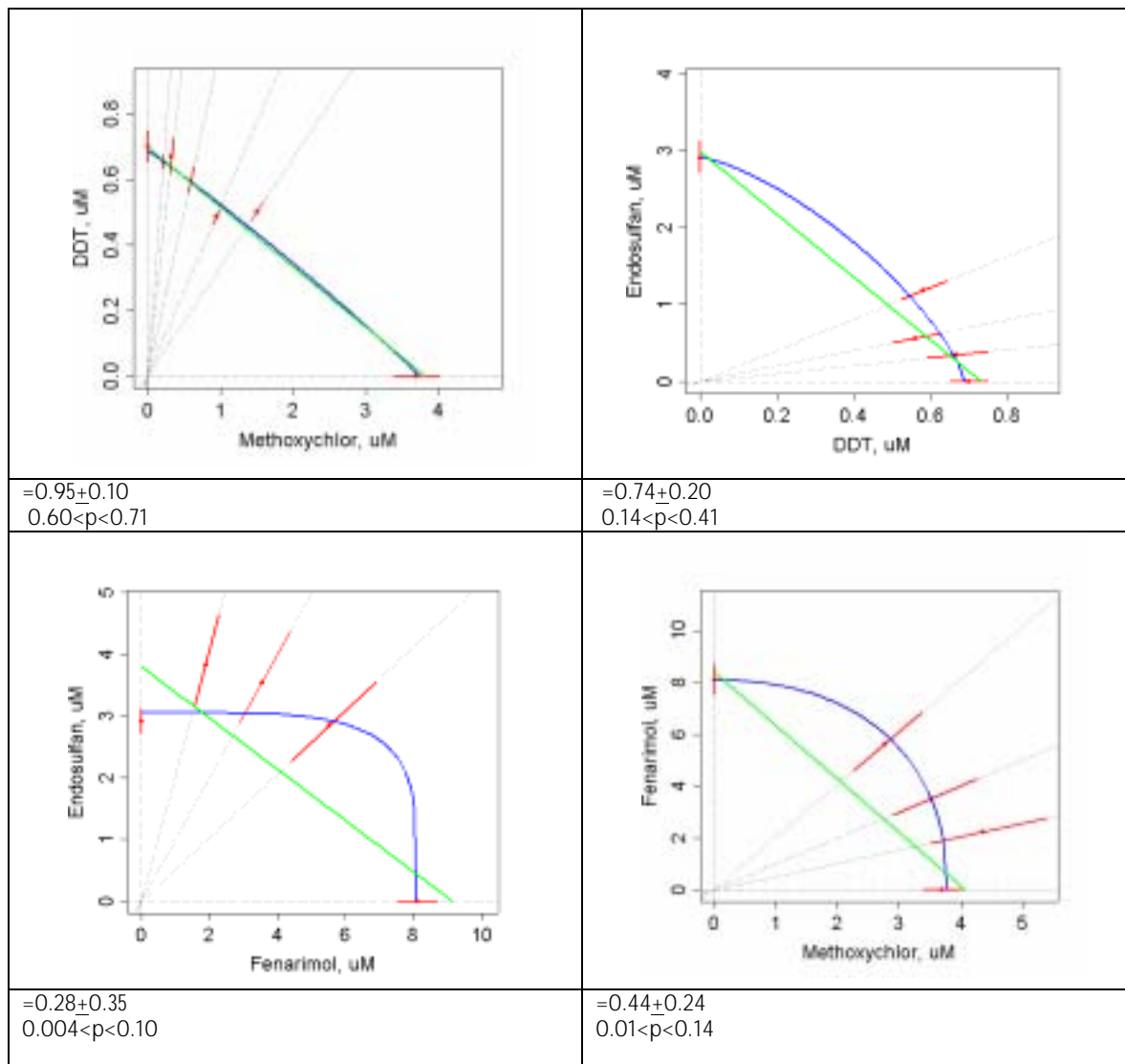
*o,p*-DDT og endosulfan viste sig at afdampe fra pladerne under inkubering og forurene de omkringliggende dyrkningshuller på mikrotiterpladen. Alle blandinger og koncentrationer af *o,p*-DDT og endosulfan er derfor blevet undersøgt på separate mikrotiterplader med 2-hullers afstand mellem de enkelte koncentrationsrækker.

Alle fire pesticider stimulerede koncentrationsafhængigt proliferationen af MCF-7 cellerne som tegn på østrogen virkning (Figur 26). Det var imidlertid kun *o,p*-DDT og endosulfan, som inducerer et fuldt østrogen respons svarende til det maksimale respons induceret af 17-estradiol. Methoxychlor og fenarimol inducerer højst et respons svarende til omkring 60% af det maksimale respons for 17-estradiol. Desuden ses et fald i responset ved 25  $\mu$ M for de 3 af pesticiderne, hvorfor data for denne koncentration er udeladt fra den videre dataanalyse. Faldet i respons skyldes antageligt en cytotoxisk effekt på cellerne.



Figur 26. Doseringskurver for *o,p*-DDT, methoxychlor, endosulfan og fenarimol.

Da ikke alle pesticider og blandinger medførte det samme maksimale respons, er de absolutte EC-værdier anvendt til den videre dataanalyse. Det vil sige, at alle anførte EC-værdier er udtrykt i forhold til det maksimale 17-estradiol respons (f.eks. svarer  $EC_{25}$  til den koncentration af det pågældende pesticid eller blanding, som inducerer 25% af det maksimale 17-estradiol respons). EC-værdierne er bestemt direkte ud fra regressionsmodellen ved hjælp af SI-funktionen, som beskrevet af Ritz & Streibig (2004). Isobolerne ved  $EC_{50}$  og  $EC_{10}$  er vist i figur 27 og 28.

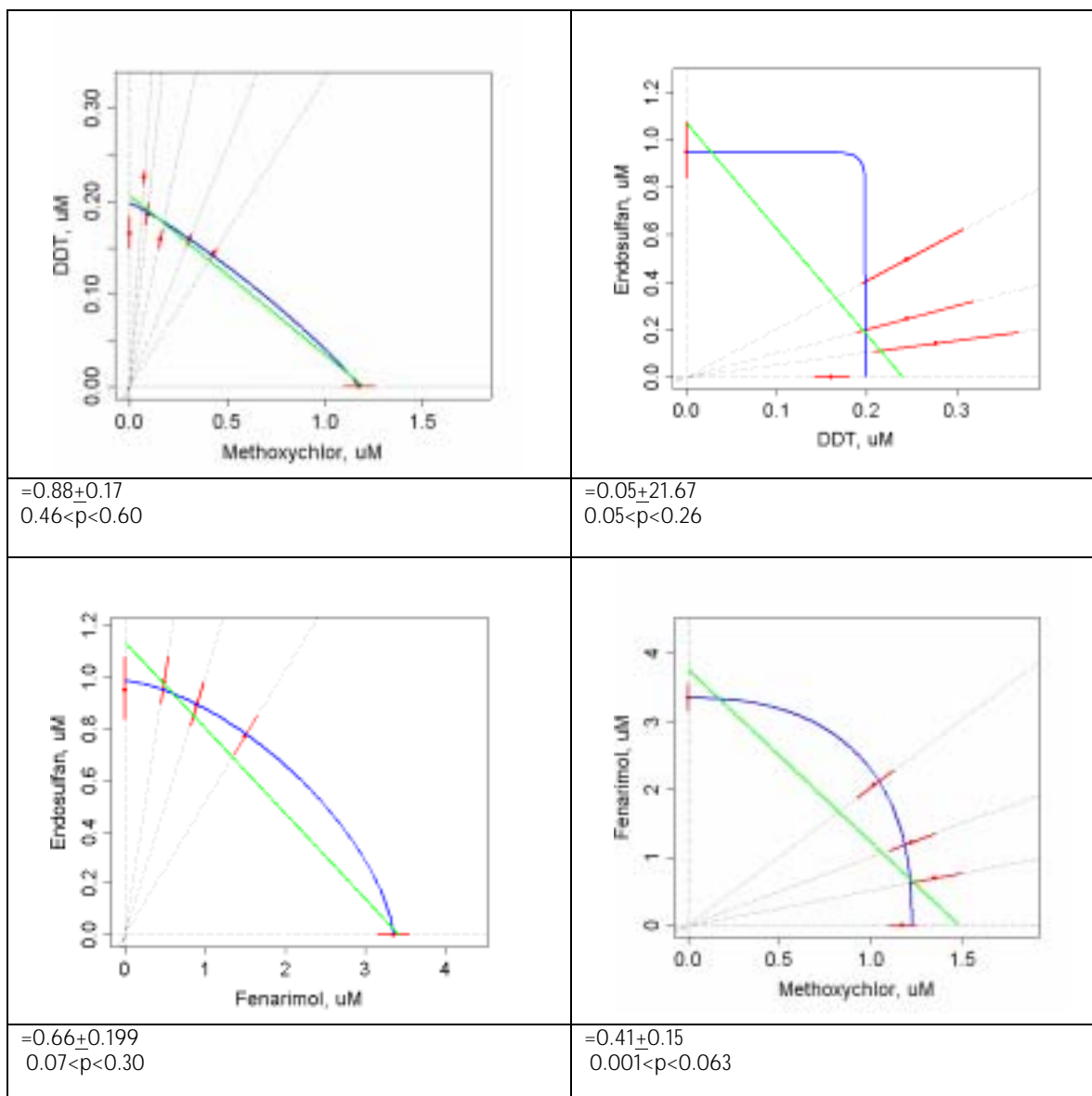


Figur 27. Estimerede EC<sub>50</sub> isoboler for de 4 undersøgte tokomponent blandinger. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre.

Isobolerne for tokomponent blandinger af *o,p*-DDT+methoxychlor og *o,p*-DDT+endosulfan viste, at de to pesticider virkede additivt ved begge effektniveauer. For de to øvrige blandinger var virkningen (vurderet med udgangspunkt i den nedre p-værdi), additiv eller antagonistisk afhængig af effektniveauet, mens der ikke blev fundet eksempler på synergistiske effekter.

De anvendte blandingsforhold imellem pesticiderne var generelt ikke optimale for beregning af isobolerne, idet der ikke var taget hensyn til forskelle i pesticidernes aktivitet. Det betød, at blandingerne ikke var jævnt fordelt langs isobolen. I forsøgene med trekomponent blandinger blev samtlige tokomponent blandinger gentaget, og i forbindelse med disse forsøg blev blandingsforholdene korrigeret (Appendiks 10).



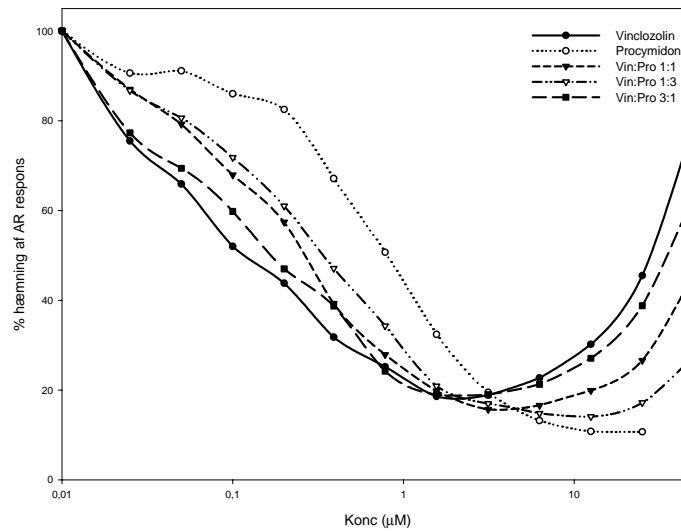


Figur 28. Estimerede EC<sub>10</sub> isoboler for de 4 undersøgte tokomponent blandinger. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre.

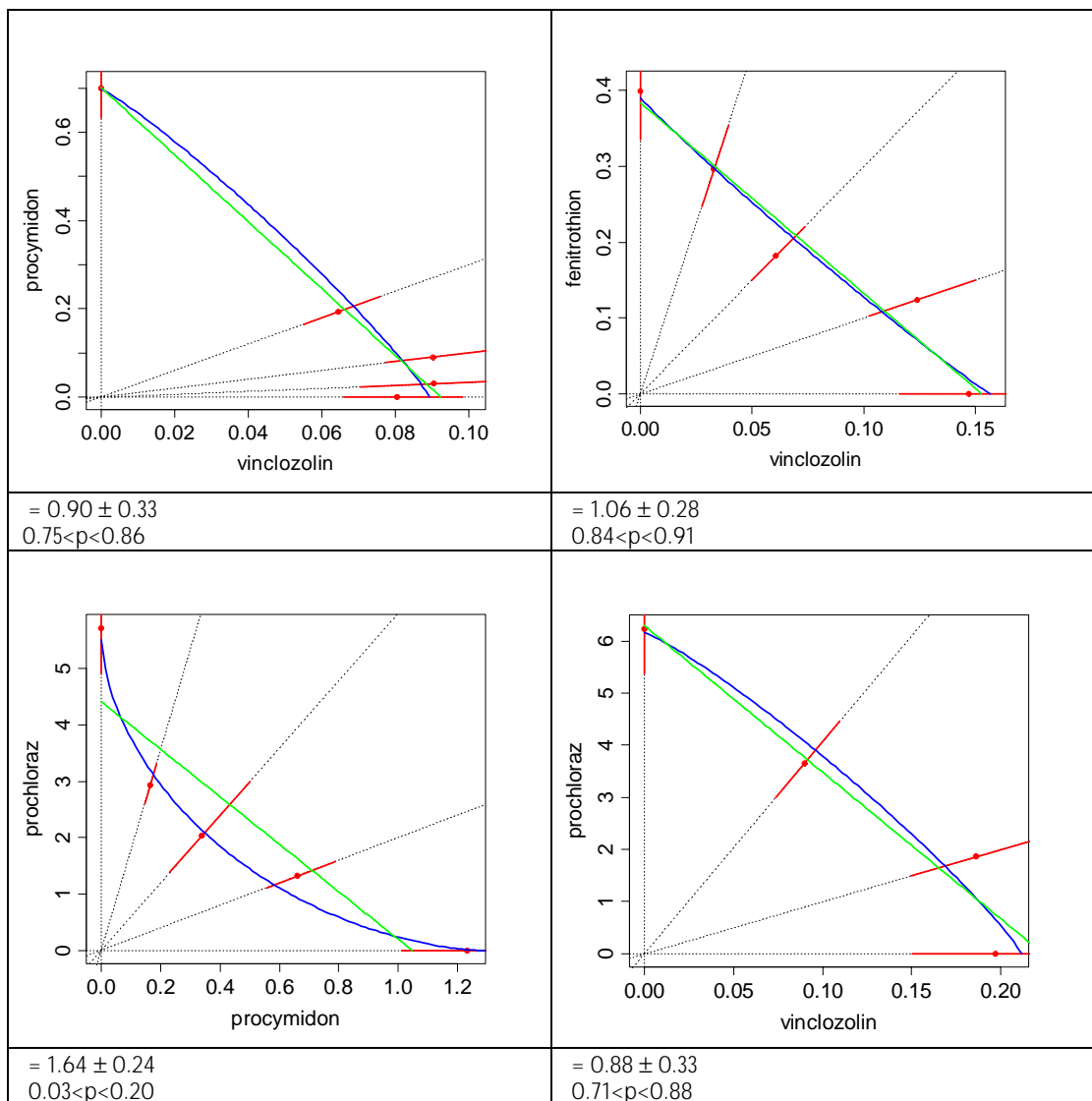
### 5.6.2 AR reportergenassay

For de enkelte pesticider procymidon, fenitrothion og prochloraz ses en antiandrogen effekt i hele koncentrationsområdet, mens der for vinclozolin ses en antiandrogen effekt op til en koncentration på ca. 3  $\mu\text{M}$ , hvorefter hæmningen forsvinder og der ses en partiel agonistisk effekt (Figur 29). Da det er metabolitterne af vinclozolin, der er de aktive antiandrogene stoffer, kan dette skyldes, at disse metabolitter er partielle agonister ved høje koncentrationer, som det også er observeret for andre kendte antiandrogene stoffer som f.eks. hydroxyflutamid. Overordnet set blev de forventede antiandrogene effekter for enkeltstofferne observeret.

Isobolerne, der afbilder de effekter, der angiver 50% hæmning af det androgen-inducerede respons (IC<sub>50</sub>), ses i figur 30, mens isobolerne beregnet ud fra IC<sub>10</sub> er vist i figur 31.

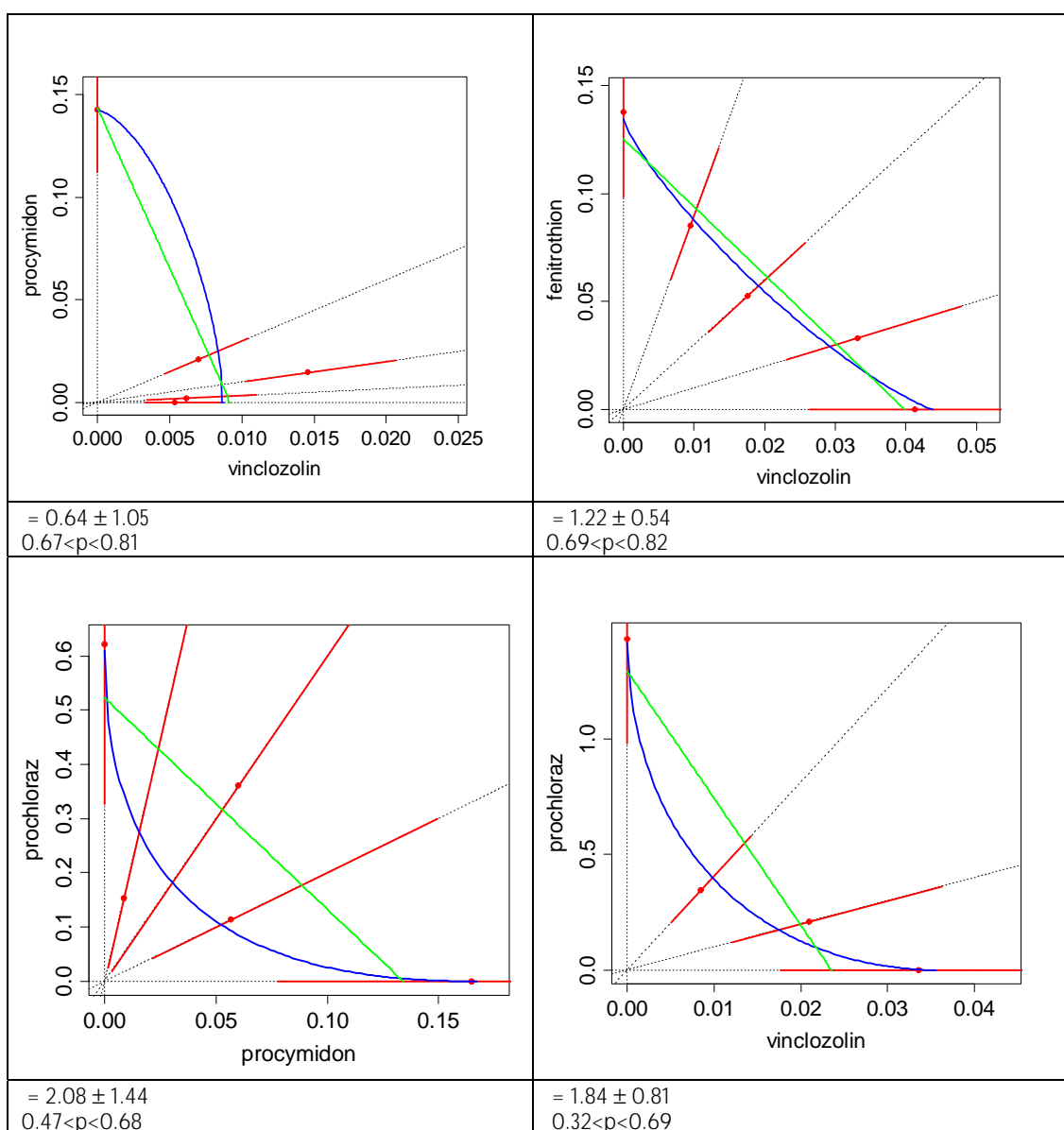


Figur 29. Doseringskurver for vinclozolin, procymidon og blandinger af de to pesticider.



Figur 30. Estimerede  $IC_{50}$  isoboler for de 4 undersøgte tokomponentblandinger. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre

Overordnet set udviste alle tokomponent-blandinger additivitet ved både  $IC_{50}$  og  $IC_{10}$ . Dette gælder også for 2. serie af tokomponentblandinger, som kan ses i Appendiks 11. Dog var der den undtagelse, at blandingen af procymidon og prochloraz gav statistisk signifikant afvigelse fra additivitet (figur 30). Da den samme blanding blev undersøgt i 2.serie i forbindelse med forsøgene af trekomponent blandingerne (se appendix 11), var der klar additivitet. Vi formoder derfor, at afvigelsen skyldes analyseusikkerhed. Alt i alt indikerer resultaterne, at tokomponent blandinger af de undersøgte pesticider virker additivt i det anvendte assay, og at der ikke er nogen interaktion mellem stofferne.



Figur 31. Estimerede  $IC_{10}$  isoboler for de 4 undersøgte tokomponentblandinger. Se figur 8 for forklaring af isobolerne og statistiske parametre

### 5.6.3 Afrunding

De opnåede resultater viser samlet set, at tokomponentblandinger af pesticiderne udviser additivitet eller svag antagonistisk effekt i MCF-7 celle proliferationsassayet.

Resultaterne stemmer godt overens med andre *in vitro* undersøgelser af kombinationseffekter af østrogen virkende stoffer. Således blev blandinger af *o,p*-DDT, *p,p*-DDT, *p,p*-DDE og  $\gamma$ -HCH påvist at virke additivt vurderet ud fra ADM-modellen i MCF-7 celle proliferationsassayet (Payne et al., 2001). Ligeledes blev der for to-, tre- og firekomponent blandinger af *o,p*-DDT, genistein, 4-nonylphenol og 4-n-octylphenol testet i et østrogenreceptor (ER) reporter gen assay i gærceller fundet additiv virkning, når data blev vurderet både i forhold til ADM- og MSM-modellen (Payne et al., 2000).

De svage antagonistiske effekter set med blandinger indeholdende fenarimol kan have flere forskellige årsager. Det kan skyldes, at pesticiderne ikke aktiverer ER identisk, idet aktiveringen af ER er meget kompleks og kræver et nøje samspil mellem receptor, ligand og en række cofaktorer. En anden mulighed er en gensidig påvirkning af nedbrydningen af pesticiderne, da MCF-7 cellerne har en vis metabolisk aktivitet. Da fenarimol vides at påvirke en række enzymer (primært cytochrom P450 enzymer) involveret i omsætning af steroider og fremmedstoffer, kan dette være en medvirkende årsag til, at netop blandinger med fenarimol udviser antagonistisk virkning. Især kan det tænkes at have betydning i relation til methoxychlor, hvor det er en metabolit, som er den egentlige ER agonist (Ousterhout et al., 1981). Endelig kan den observerede antagonisme skyldes en cytotoxisk hæmning af MCF-7 cellernes vækst forårsaget af cytotoxiske kombinationseffekter. En sådan mekanisme er foreslået i et studie hvor man ligeledes observerede antagonistiske effekter i blandinger, hvor 4-nonylphenol eller 4-tert-octylphenol indgik (Rajapakse et al., 2004).

I et enkelt studie, hvor andres data fra testning af blandinger i MCF-7 celle proliferationsassayet er blevet genanalyseret ved hjælp af ADM modellen, fandt man tegn på synergistisk virkning for blandinger af *o,p*-DDT og *p,p*-DDT (Kortenkamp & Altenburger, 1998). Da genanalysen er foretaget på de publicerede resultater uden adgang til de oprindelige data, er der dog stor usikkerhed forbundet med denne konklusion.

For stort set alle tokomponent blandinger af pesticider testet for androgenreceptor inhibering viste resultaterne et additivt respons. Dette indikerer, at pesticiderne ikke interagerer ved aktivering af receptoren, og at de virker via samme mekanisme. Der er således ikke umiddelbart nogen grund til at tro, at synergistiske eller antagonistiske samspilseffekter for disse antiandrogene pesticider finder sted ved blokering af androgenreceptoren *in vitro*. Dette understøttes af den viden, vi har opnået i tidligere forsøg med dette *in vitro* testsystem. Effekten af tokomponent blandinger af vinclozolin og procymidon er tidligere fundet at være additiv *in vitro* og *in vivo* (Nellemann et al., 2002; Vinggaard et al., 2004), og den samme additive effekt er fundet for en blanding af pesticiderne deltamethrin, methiocarb, prochloraz, tribenuron-methyl og simazin (Birkhøj et al., 2004).

Generelt understøttes resultaterne vedrørende ER-medieret celleproliferation og AR-inhibering af de øvrige *in vitro* undersøgelser om kombinationseffekter af kemiske stoffer med samme virkningsmekanisme. Den generelle additive virkning betyder således, at kombination af en række enkeltstoffer, der ikke i sig selv har nogen målelig effekt, kan medføre, at blandingen af stofferne forårsager en målelig effekt, hvilket er i overensstemmelse med, hvad teorien omkring ADM princippet predikterer (Rajapakse et al., 2002; Silva et al., 2002).

## 6 Trekomponent blandinger

I dette kapitel præsenteres resultaterne fra forsøgene med trekomponent blandinger. Som i kapitel 4 vil resultaterne for hver testsystem blive præsenteret enkeltvis, og diskussionen af resultaterne vil ligeledes være begrænset til de enkelte testsystemer. I det efterfølgende kapitel 6 vil resultaterne af forsøgene med både to- og trekomponent blandinger blive diskuteret på tværs af testsystemer.

I dette kapitel er det valgt at præsentere resultaterne med trekomponent blandingerne uden resultaterne for de tre sammenhørende tokomponent blandinger (se kapitel 3). Disse resultater kan ses i Appendiks 7-11.

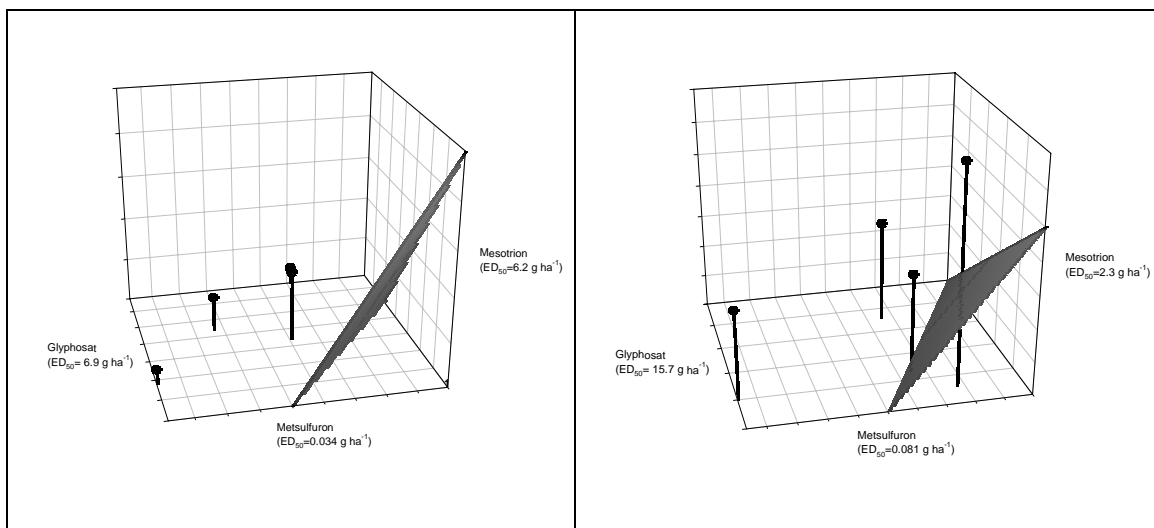
For hver blanding er beregnet både ED/EC/IC<sub>50</sub> isobolerne. Resultaterne af tokomponent blandingerne er analyseret og præsenteret som i kapitel 4, mens trekomponent blandingerne blev evalueret visuelt vha. af en 3-dimensionel figur, hvor ADM isobolplanet var indtegnet.

### 6.1 Terrestriske planter

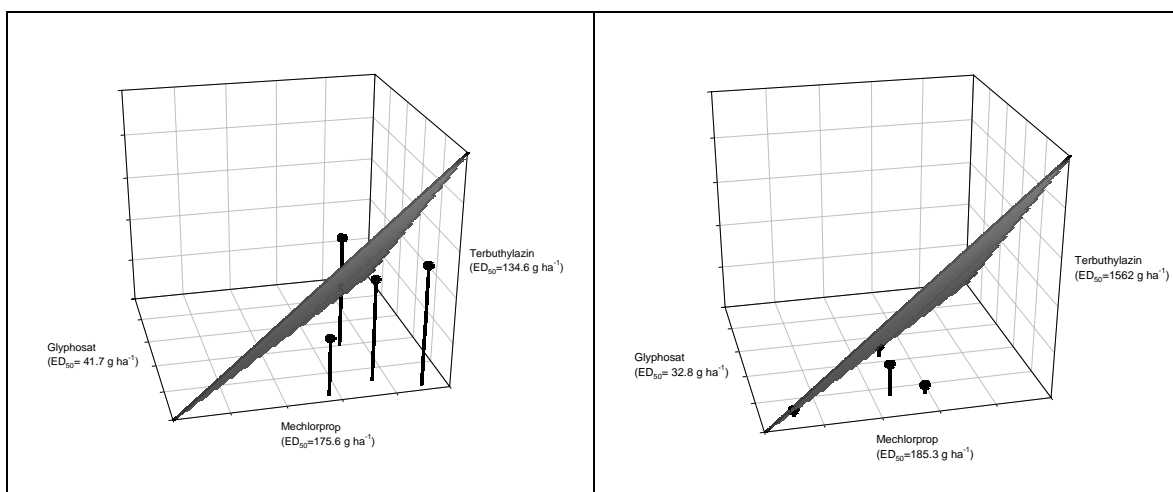
Forsøgene med de 4 trekomponent blandinger blev alle gentaget, og i 6 af de i alt 8 forsøg var det muligt at beregne både ED<sub>50</sub> og ED<sub>10</sub> isobolerne, mens det i to forsøg (glyphosat+metsulfuron+mesotrion og glyphosat+mechlorprop+mesotrion) kun var muligt at beregne ED<sub>50</sub> isobolerne.

De to forsøg med hver trekomponent blanding udviste sammenfaldende resultater med undtagelsen af ED<sub>10</sub> isobolerne for aciflourfen+mesotrion+terbuthylazin. I dette kapitel er kun vist de 3-dimensionelle figurer, som illustrerer effekten af trekomponent blandingerne. I Appendiks 7 er vist de sammenhørende resultater med to- og trekomponent blandingerne.

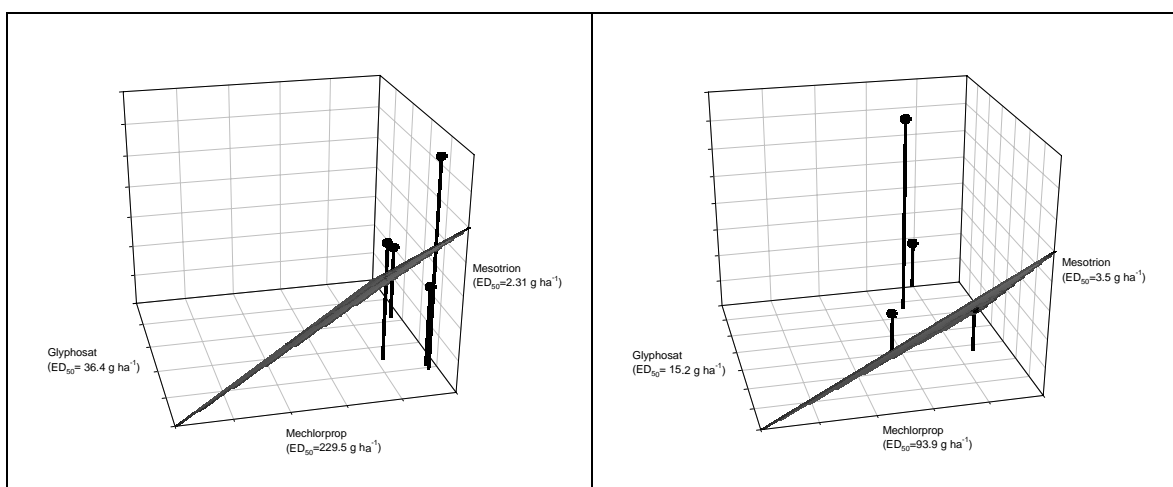
Blandingen glyphosat+metsulfuron+mesotrion var medtaget som et eksempel på en trekomponent blanding, hvor de 3 tokomponent blandinger var additive. Som forventet afveg tokomponent blandingerne ikke fra ADM med undtagelse af blandingen metsulfuron+mesotrion i forsøg 2, hvor der blev observeret antagonisme vurderet med udgangspunkt i den laveste p-værdi. På trods af at tokomponent blandingerne med en enkelt undtagelse ikke afveg fra ADM, blev der i begge forsøg observeret en markant antagonisme med trekomponent blandingen på såvel 50% som 10% effektniveauet (Figur 32 og Appendiks 7).



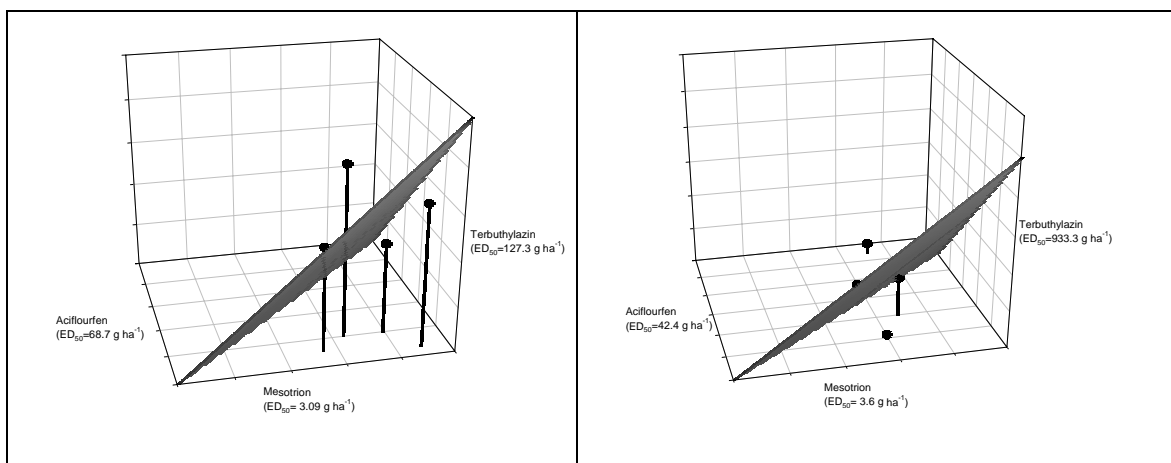
Figur 32. ED<sub>50</sub> værdier af glyphosat+metsulfuron+mesotrion. Det skraverede plan angiver placering af ED værdier ved additivitet (forsøg 1 og 2).



Figur 33. ED<sub>50</sub> værdier af glyphosat+mechl orprop+terbuthylazin. Det skraverede plan angiver placering af ED værdier ved additivitet (forsøg 1 og 2).



Figur 34. ED<sub>50</sub> værdier af glyphosat+mechl orprop+mesotrion. Det skraverede plan angiver placering af ED værdier ved additivitet (forsøg 1 og 2).



Figur 35.  $ED_{50}$  værdier af aciflourfen+mesotrion+terbuthylazin. Det skraverede plan angiver placering af  $ED$  værdier ved additivitet (forsøg 1 og 2).

Glyphosat+mechlorprop+terbuthylazin repræsenterede en trekomponent blanding, hvor der på mindst et af de to analyserede effektive niveauer var observeret antagonisme med alle 3 tokomponent blandinger. Dette var imidlertid ikke tilfældet i forsøget med trekomponent blandingen, idet der i forsøg 1 ikke blev observeret afvigelser fra ADM, mens der i forsøg 2 blev fundet en synergistisk vekselvirkning imellem mechlorprop og terbuthylazin (Figur 33).

Effekterne af de undersøgte trekomponent blandinger lå med enkelte undtagelser tæt på ADM isobolplanet og nogenlunde ligeligt fordelt under og over isobolplanet, og det kan derfor konkluderes, at effekten af denne trekomponent blanding var additiv (Figur 33).

Med blandingen glyphosat+mechlorprop+mesotrion var det forventningen, at én af tokomponent blandingerne (glyphosat+mechlorprop) var antagonistisk, mens de to øvrige virkede additivt. Forsøgene viste imidlertid, at alle 3 tokomponent blandinger virkede additivt (Figur 34).

Effekten af trekomponent blandingerne var generelt lavere end forventet, men afvigelserne fra ADM isobolplanet var større i forsøg 2 end i forsøg 1. Sammenfattende kan det konkluderes, at der med trekomponent blandinger bestående af glyphosat, mechlorprop og mesotrion overvejende er fundet antagonistiske vekselvirkninger, som tilfældet var med blandinger af glyphosat, metsulfuron og mesotrion.

Blandingen aciflourfen+mesotrion+terbuthylazin var medtaget som et eksempel på en blanding, hvor en tokomponent blanding udviste synergisme (mesotrion+ terbuthylazin), mens de to øvrige virkede additivt. Som det fremgår af Appendiks 7 var det kun i forsøg 2 og kun på  $ED_{50}$  niveauet, at der blev observeret en synergistisk vekselvirkning imellem mesotrion og terbuthylazin. I forsøg 1 virkede alle tokomponent blandingerne additivt.

I begge forsøg blev der på  $ED_{50}$  effektive niveauet observeret effekter tæt på ADM isobolplanet. På  $ED_{10}$  effektive niveauet blev der i forsøg 1 ligeledes observeret effekter, som indikerede en additiv virkning af de 3 herbicider, hvorimod der i forsøg 2 blev registreret en klar antagonistisk vekselvirkning (Figur 35).

Sammenfattende kan det konkluderes, at forsøgene med trekomponent blandinger har vist, at blandingerne enten virker additivt eller antagonistisk, mens synergisme ikke forekom. Denne konklusion er i overensstemmelse med konklusionen fra forsøgene med tokomponent blandinger (se kapitel 5).

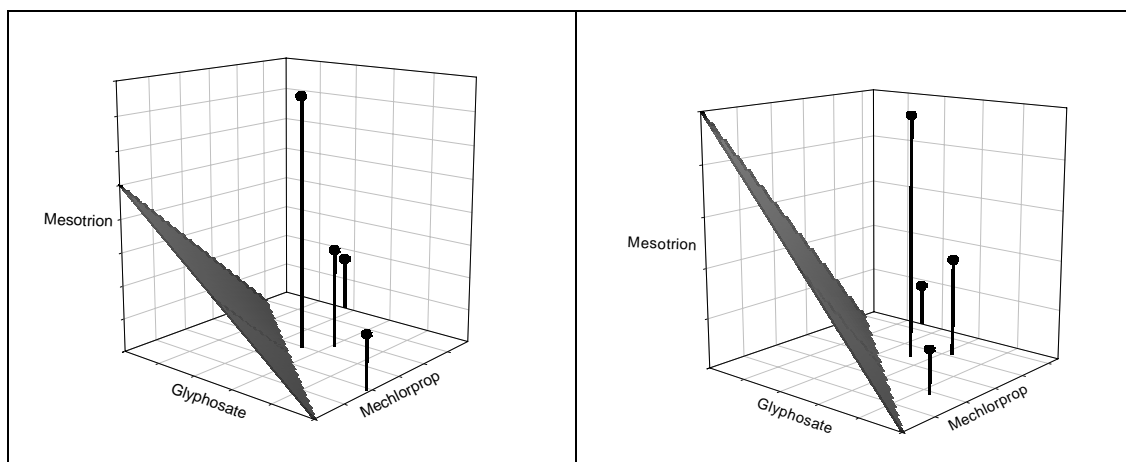
### 6.1.1 Afrunding

I litteraturen findes ikke resultater fra undersøgelser, som kan sammenlignes med de undersøgelser, der er udført som led i dette projekt, og det er derfor ikke muligt at sammenholde resultaterne med resultater fra tidligere undersøgelser.

Det er interessant, at konklusionerne fra forsøgene med tokomponent blandinger kan udvides til også omfatte trekomponent blandinger, og i forlængelse heraf ville det være interessant at søge svar på, hvorvidt det samme gælder for blandinger indeholdende mere end 3 herbicider.

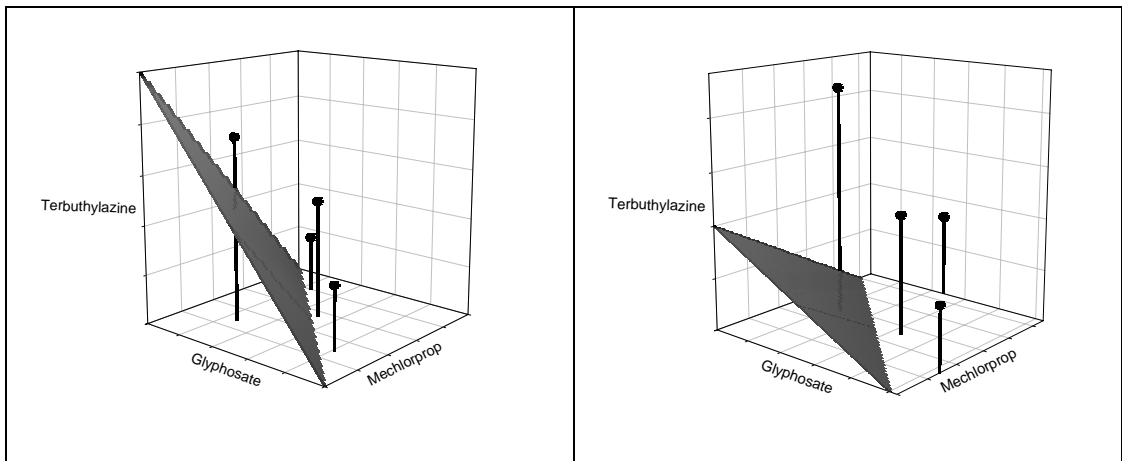
### 6.2 Akvatiske planter

Det var kun muligt at sammensætte trekomponent blandingerne af tokomponent blandinger, der udviste additivitet eller antagonisme. Samtlige resultater med trekomponent blandinger og de sammenhørende tokomponent blandinger er vist i Appendiks 8. I figur 36-39 er vist resultaterne fra de to forsøg med hver af de undersøgte trekomponent blandinger.

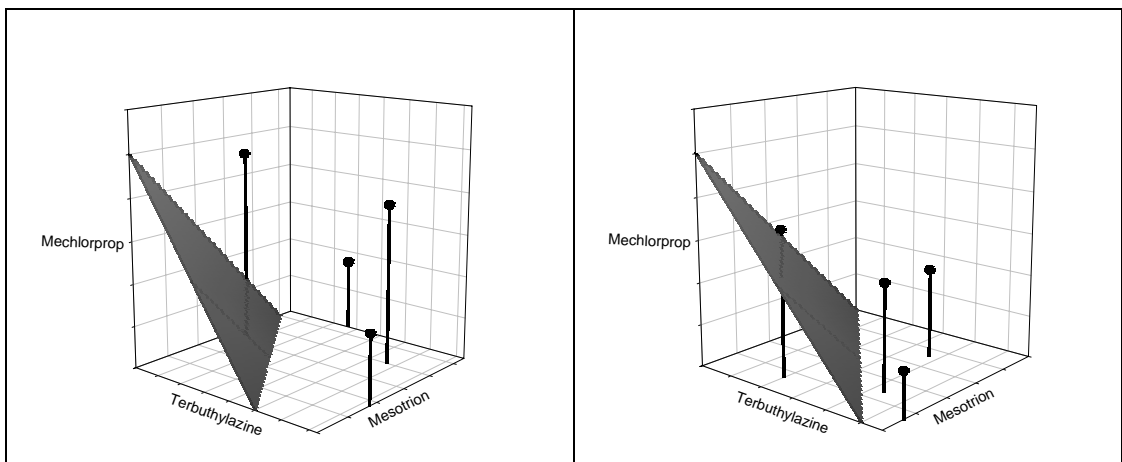


Figur 36. EC<sub>50</sub>-værdier af glyphosat+mechlorprop+mesotrion. Det skraverede plan angiver placering af EC-værdier ved additivitet (forsøg 1 og 2).

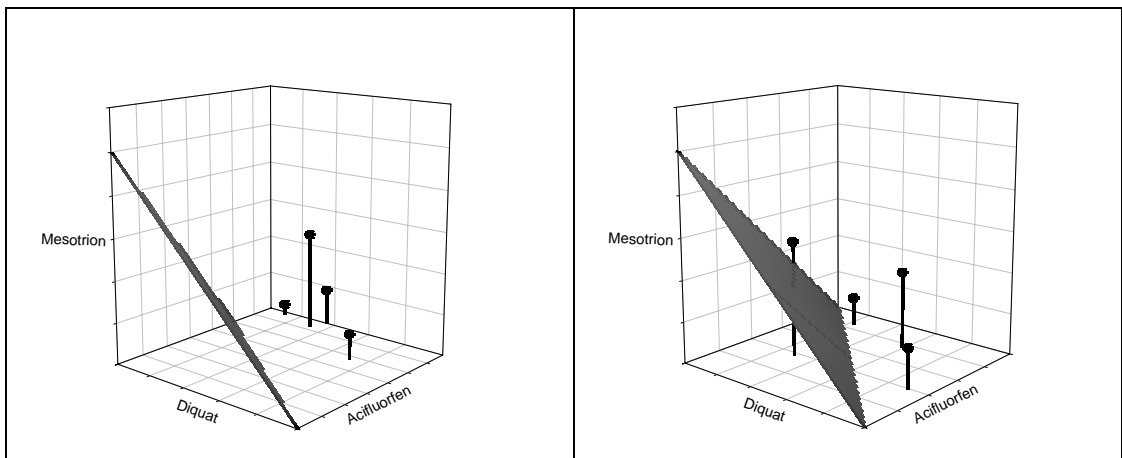




Figur 37. EC<sub>50</sub> værdier for blandingen glyphosate+mechl orprop+terbuthylazin. Det skraverede plan angiver placering af EC-værdier ved additivitet (forsøg 1 og 2).



Figur 38. EC<sub>50</sub> værdier for blandingen mechl orprop+mesotrion+terbuthylazin. Det skraverede plan angiver placering af EC-værdier ved additivitet (forsøg 1 og 2).



Figur 39. EC<sub>50</sub> værdier for blandingen acifluorfen+diquat+mesotrion. Det skraverede plan angiver placering af EC-værdier ved additivitet (forsøg 1 og 2).

Af figur 35-38 fremgår, at samtlige trekomponent blandinger udviser en lavere effekt, end den der var forudsagt ved den additive model. Herbiciderne udviser altså en antagonistisk respons i samtlige af de trekomponent blandinger, der er undersøgt, og resultaterne er dermed sammenfaldende med resultaterne fra forsøgene med tokomponent blandinger, hvor der blev registreret antagonisme med 11 af de 17 undersøgte blandinger (se kapitel 4).

### 6.2.1 Afrunding

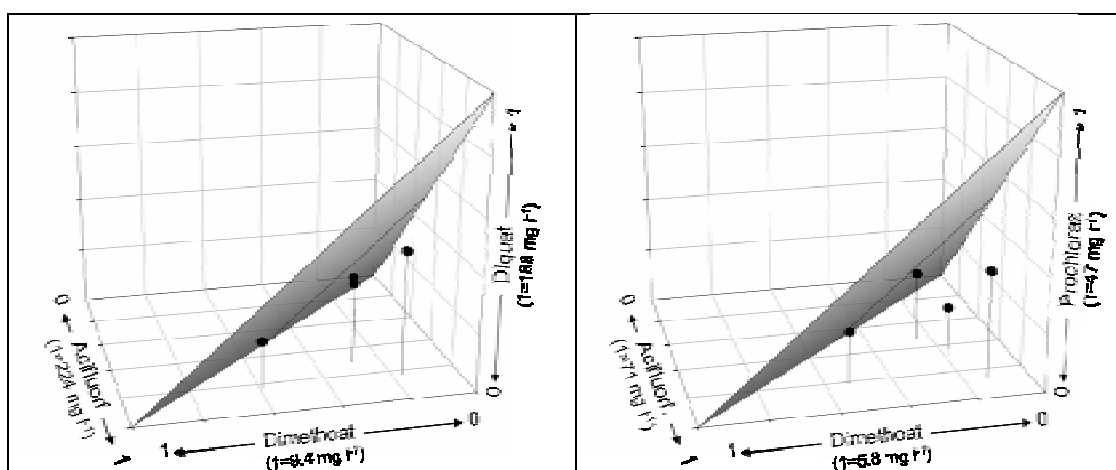
Der er undersøgt adskillige flerkomponent blandinger på alger (Faust et al., 2003, Faust et al., 2001, Junghans et al., 2003), men kun i enkelte fikserede blandingsforhold. For narkotiske stoffer, d.v.s. stoffer hvis toksiske virkning er, at de indlejre sig i cellemembranerne, er det vist, at jo flere stoffer man blander, jo bedre kan den samlede effekt beskrives med additionsmodellen (Warne & Hawker 1995). I forsøgene med *Lemna* så vi en endnu større grad af antagonisme, end det umiddelbart var forventet med baggrund i de binære blandinger. Der er ikke nogen umiddelbar indlysende forklaring på denne voldsomme antagonisme. Men set i en reguleringsammenhæng, kan det bekræftes også for trekomponent blandinger, at additionsmodellen vil overvurdere effekterne af herbicidblandinger på vandplanter som *Lemna minor*.

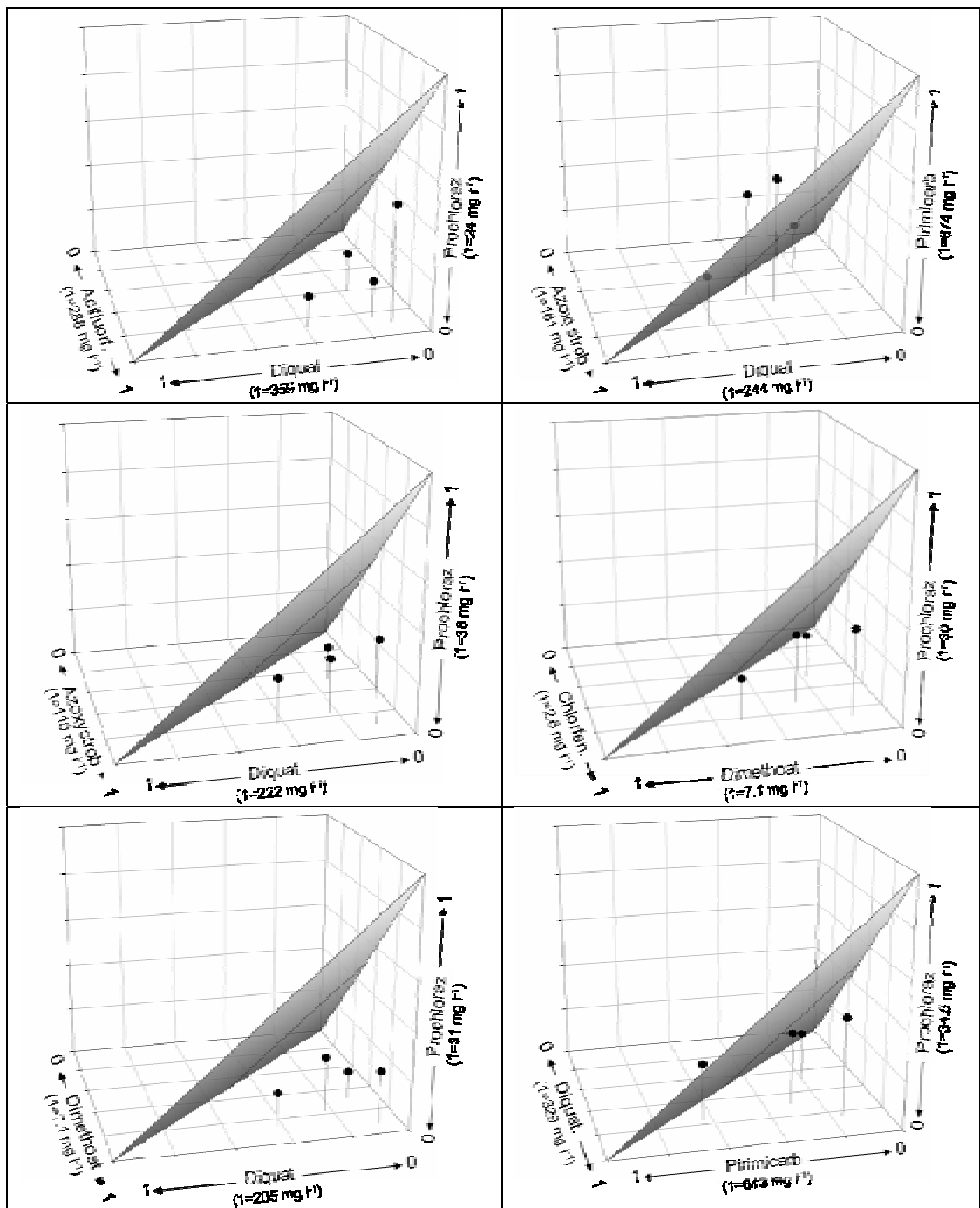
### 6.3 Akvatiske bakterier

Samtlige resultater med trekomponent blandinger og de tilhørende tokomponent blandinger er vist i Appendiks 7.

I forsøgene med tokomponent blandinger blev der som regel udløst synergisme, når prochloraz indgik som det ene pesticid, mens der som regel var additiv virkning i blandinger uden prochloraz (se afsnit 5.4). I forsøgene med trekomponent blandinger blev der derfor fokuseret på blandinger, hvor prochloraz indgik.

Der er udført forsøg med i alt 8 trekomponent blandinger, og af disse 8 blandinger blev der fundet en synergistisk virkning med 4 til 5 (se figur 40). Denne vurdering er baseret på en visuel vurdering af  $EC_{50}$ -værdiernes placering i forhold "planet", som forventes ved simpel additiv virkning.





Figur 40. EC<sub>50</sub> værdier af trekomponent blandinger. Det skraverede plan angiver placering af EC værdier ved additivitet. Blandingen acifluorfen+dimethoat+prochloraz er udført med formuleret acifluorfen, mens de to øvrige blandinger, hvor acifluorfen indgår, er udført med teknisk acifluorfen.

Som det var tilfældet med tokomponent blandinger, var der oftest synergisme med trekomponent blandingerne, hvis prochloraz indgik som det ene pesticid. En undtagelse var i blandingen diquat + pirimicarb + prochloraz, hvor tokomponent blandinger med prochloraz viste synergisme, mens trekomponent blandingen viste additiv virkning. I figur 40 (nederst) kan det ses, at der var additivitet uanset andelen af prochloraz i blandingen. Blandt de anvendte pesticider synes prochloraz derfor at indtage en særstilling ved næsten altid at udløse synergisme, når fungicidet indgår i blandinger.

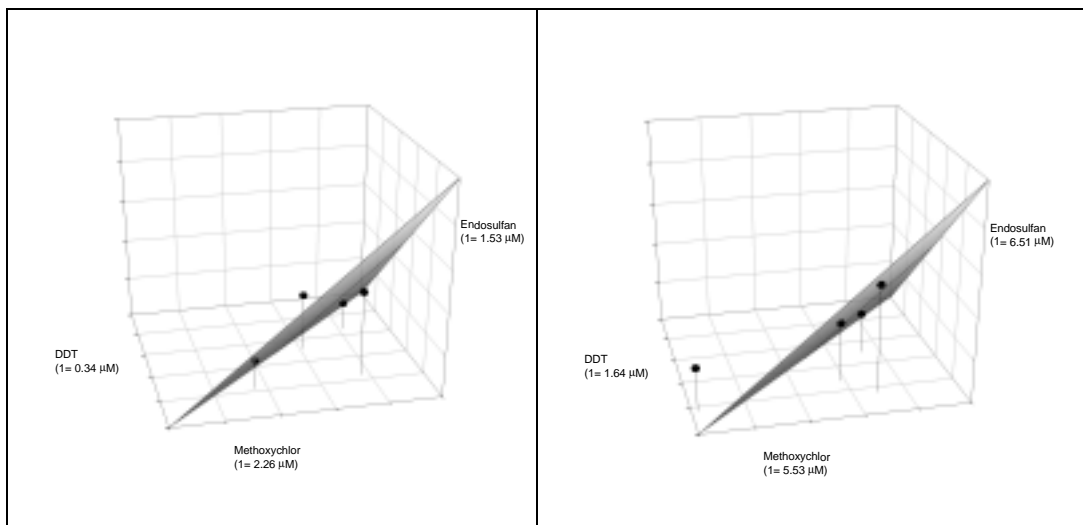
### 6.3.1 Afrunding

I den tilgængelige litteratur har det ikke været muligt at finde resultater med trekomponent blandinger, og det var derfor ikke muligt at sammenholde resultaterne fra dette projekt med resultater fra tidligere undersøgelser.

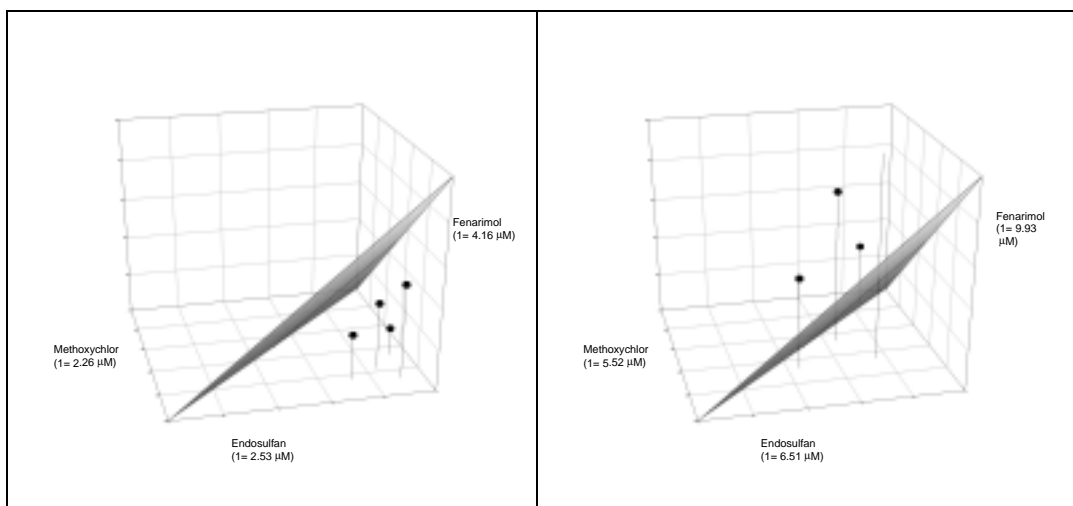
## 6.4 Hormonforstyrrende effekter

### 6.4.1 MCF7 celleproliferationsassay

Der er undersøgt to- og trekomponent blandinger af *o,p*-DDT, methoxychlor og endosulfan samt methoxychlor, endosulfan og fenarimol. Data er analyseret som beskrevet for tokomponent blandinger, dog var den 3-parametriske log-logistiske funktion en bedre model for nogle af blandingerne, idet den 4-parametriske model estimerede urealistiske høje øvre grænser for doseringskurverne. Det skyldes at blandingerne i denne serie generelt er udført ved lave koncentrationer, som giver effekter på den lineære del af den sigmoide doseringskurve og altså før der sker en begyndende udfladning af kurven. I figur 41 og 42 er vist  $EC_{10}$  og  $EC_{50}$  isobolerne for de to blandinger. Samtlige resultater med trekomponent blandingerne og de sammenhørende tokomponent blandinger er vist i Appendiks 8.



Figur 41.  $EC_{10}$  (til venstre) og  $EC_{50}$  (til højre) værdier for blandingen *o,p*-DDT+ methoxychlor+endosulfan. Det skraverede plan angiver placering af  $EC$ -værdier ved additivitet.



Figur 42.  $EC_{10}$  (til venstre) og  $EC_{50}$  (til højre) værdier for blandingen methoxychlor+endosulfan+fenarimol. Det skraverede plan angiver placering af  $EC$ -værdier ved additivitet.

Blandinger af methoxychlor og *o,p*-DDT udviser klar additivitet ved alle effektniveauer og bekræfter således resultaterne fra tokomponent forsøgene. Blandinger af endosulfan og methoxychlor indgik ikke i tokomponentforsøgene men til gengæld i begge forsøgsserier af trekomponentblandinger. Dataanalysen viser at virkningen ikke afviger signifikant fra additivitet. Endosulfan og *o,p*-DDT virker additivt ved  $EC_{10}$ , mens der er tegn på en svag synergistisk effekt ved  $EC_{50}$  (Appendiks 10).

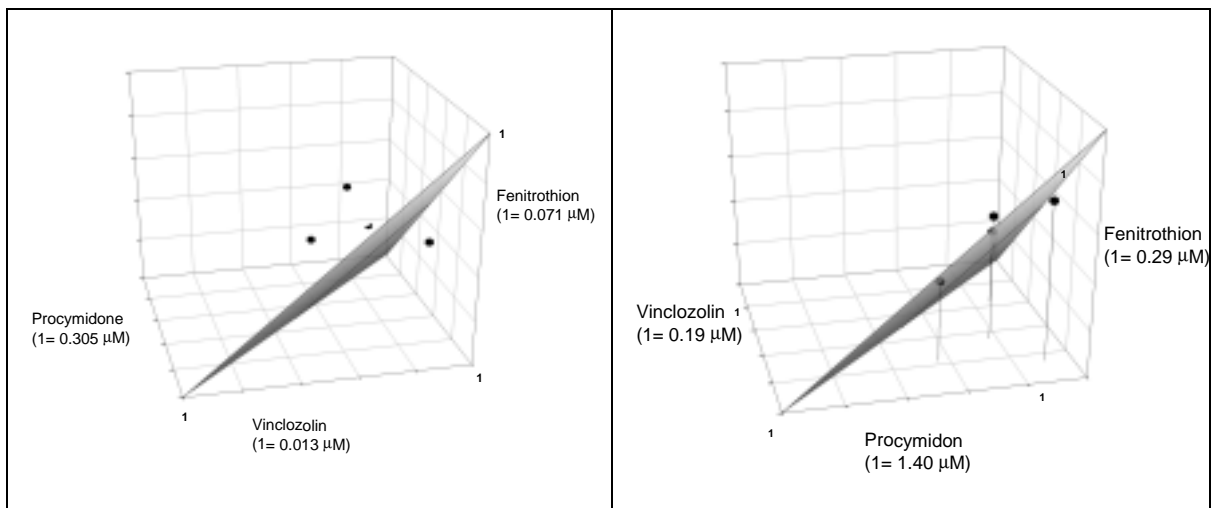
De antagonistiske effekter, der blev observeret i forsøgsserien med tokomponent blandinger, hvor fenarimol indgik, blev bekræftet for blandingen af fenarimol og endosulfan ved  $EC_{50}$ , mens effekten var additiv ved  $EC_{10}$ . Virkningen af binære blandinger mellem fenarimol og methoxychlor afveg derimod ikke fra additivitet ved de to effektniveauer.

Den samlede konklusion på de udførte testninger af binære blandinger i MCF-7 celle proliferationsassayet er at pesticiderne generelt virker additivt og i nogle tilfælde svagt antagonistiske. Kun en enkelt blanding, *o,p*-DDT og endosulfan, udviste tegn på synergisme ved den højeste effektkoncentration,  $EC_{50}$ .

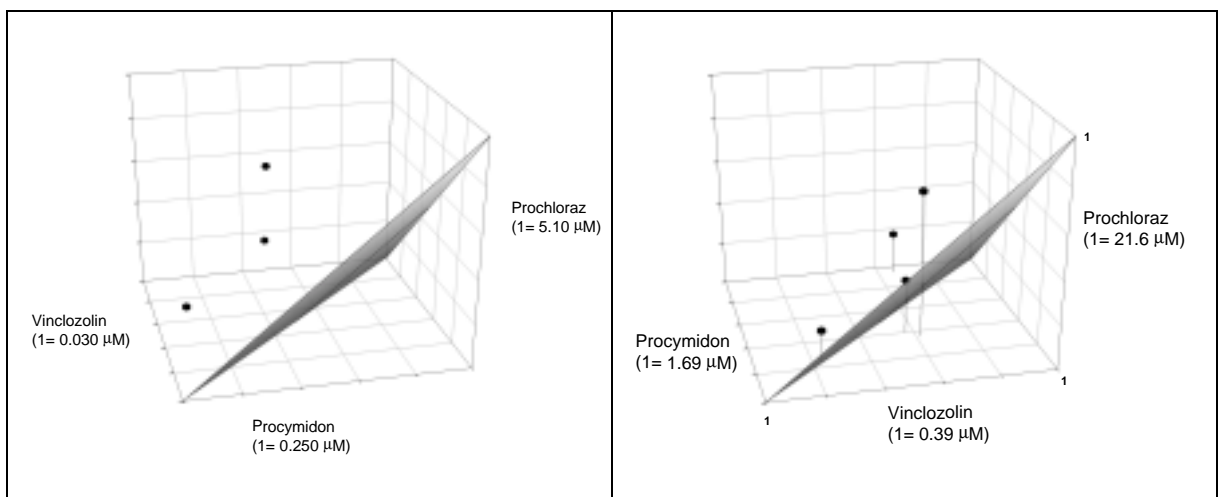
I figur 40 ses, at observationerne med blandingen *o,p*-DDT+ methoxychlor+ endosulfan lå meget tæt på ADM isobolplanet, hvilket indikerer at denne trekomponent blanding udviser additivitet. Med methoxychlor+endosulfan+fenarimol er observeret mere markante afvigelser fra ADM-isobolplanet, og umiddelbart tyder resultaterne på en svag synergistisk virkning af denne blanding  $EC_{10}$  og en svag antagonistisk virkning ved  $EC_{50}$  (Figur 41).

#### 6.4.2 AR reporter-genassay

Det er blevet undersøgt to trekomponent blandinger bestående af vinclozolin+ procymidon+fenitrothion samt vinclozolin+procymidon+prochloraz. Samtlige resultater med trekomponent blandingerne og de tilhørende tokomponent blandinger er vist i Appendiks 11. I figur 42 og 43 er vist  $IC_{10}$  og  $IC_{50}$  isobolerne for de to blandinger.



Figur 42.  $IC_{10}$  (til venstre) og  $IC_{50}$  (til højre) værdier for blandingen vinclozolin+procymidon+fenitrothion. Det skraverede plan angiver placering af IC-værdier ved additivitet.



Figur 43.  $IC_{10}$  (til venstre) og  $IC_{50}$  (til højre) værdier for blandingen vinclozolin+procymidon+prochloraz. Det skraverede plan angiver placering af IC-værdier ved additivitet.

Med blandingen vinclozolin+procymidon+fenitrothion er der fundet effekter, som ligger meget tæt på ADM isobolplanet specielt ved  $IC_{50}$ , hvilket indikerer, at denne blanding virker additivt.

For blandingen vinclozolin+procymidon+prochloraz fordeler punkterne sig relativt pænt omkring isobolplanen ved  $IC_{50}$ , men tendensen er, at effekten er lavere end forventet ved additivitet. Ved  $IC_{10}$  er der større afvigelser, og punkterne ligger længere fra isobolplanen. Disse resultater kunne indikere, at trekomponent blandingen især virker antagonistisk ved lave koncentrationer, men kan også være et udtryk for analyseusikkerhed. Set i lyset af at effekterne af de tilhørende tokomponent blandinger er relativt entydige (Appendiks 11), er den sidste mulighed meget sandsynlig.

### 6.4.3 Afrunding

De opnåede resultater for trekomponentblandingerne østrogene effekter viser additivitet for blandinger af DDT+methoxychlor+endosulfan, mens blandingen af methoxychlor+endosulfan+fenarimol udviste tendens til enten antagonisme eller synergisme. Der ses derfor det samme mønster som for tokomponentblandingerne, at når fenarimol indgår i blandingen ses der

afvigelse fra additivitet. Det kan skyldes en eller flere af fenarimols andre effekter som beskrevet i afsnit. 5.6.3.

Mht. de antiandrogene effekter viste trekomponentblandingen af vinclozolin + procymidon + fenarimol tegn på additiv effekt, hvorimod blandingen af vinclozolin+procymidon+prochloraz viste tegn på antagonistiske effekter. Prochloraz ligner fenarimol noget, idet den også kan inducere eller hæmme cytochrom P450 enzymer og i det hele taget har mange andre effekter end den rent AR antagonistiske. Dog er det vanskeligt at forklare at prochloraz skulle virke antagonistisk i trekomponent men ikke i tokomponent blandinger. Generelt kan siges, at usikkerheden på bestemmelse af  $IC_{10}$  er større end ved bestemmelsen af  $IC_{50}$  og derfor bør der lægges mere vægt på  $IC_{50}$  isobolerne.

Som beskrevet i afsnit 4.6.3 er der tidligere blevet undersøgt enkelte 3-, 4-, 8- eller 11-komponentblandinger for østrogene effekter i enten MCF7 celleproliferationsassayet eller et reporter gen assay baseret på gærceller (Payne et al., 2000; Payne et al., 2001; Silva et al., 2002; Rajapakse et al., 2002). Mht. de antiandrogene effekter er der tidligere undersøgt en 5-komponentblanding i samme assay system, som det der er brugt i dette projekt (Birkhøj et al., 2004). I alle disse studier er der ikke foretaget nogen egentlig statistisk behandling af data, men den observerede effekt er sammenlignet med den predikterede effekt på basis af additivitet. I alle tilfælde findes ingen klare afvigelser fra ADM modellen.





# 7 Generelle konklusioner

I de foregående to kapitler er resultaterne med to- og trekomponent blandinger præsenteret, og for hvert testsystem er resultaterne diskuteret kort og sammenholdt med den foreliggende viden på området. I dette kapitel vil resultaterne blive sammenholdt på tværs af testsystemer.

Som nævnt i kapitel 3 er der for hvert testsystem med undtagelse af de to testsystemer, som belyser de hormonforstyrrende effekter af pesticider, undersøgt 3 forskellige kategorier af tokomponent pesticidblandinger. De 3 kategorier af blandinger var henholdsvis 1) pesticider med samme virkningsmekanisme, 2) pesticider med samme virkemåde men forskellige virkningsmekanismer samt 3) pesticider med forskellige virkemåder.

Sammensætningen af trekomponent blandingerne blev foretaget på baggrund af resultaterne med tokomponent blandingerne. Intentionen var at undersøge trekomponent blandinger bestående af pesticider, hvor responsen af pesticiderne i blandinger to og to varierende. For trekomponent blandingeres vedkommende var det altså ikke pesticidernes virkningsmekanisme eller virkemåde, som blev lagt til grund for sammensætningen men derimod deres respons i de forudgående forsøg med tokomponent blandinger.

Et af de primære formål med nærværende projekt var at sammenstille resultater fra forsøg med pesticidblandinger fra forskellige standardiserede testsystemer, samt at undersøge om det var muligt at drage mere generelle konklusioner om pesticidblandingers effekt. I det følgende vil resultaterne med de 3 kategorier af pesticidblandinger derfor blive diskuteret samlet for alle testsystemer.

## 7.1 Tokomponent blandinger

### 7.1.1 Pesticider med samme virkningsmekanisme

For metsulfuron+triasulfuron og MCPA+mechlorprop's vedkommende var der tale om blandinger, som ikke blot har samme virkningsmekanisme, men som også er kemisk nært beslægtede, idet de tilhører samme kemiske gruppe (Tabel 2). For begge virkningsmekanismer gælder, at der findes herbicider med samme virkningsmekanismer, som tilhører andre kemiske grupper, men disse herbicidgrupper var ikke repræsenteret i forsøgene.

I modsætning til herbicidblandingerne, så tilhører de insekticider, der indgik i de 3 insekticidblandinger forskellige kemiske grupper, idet chlorfenvinphos og dimethoat tilhører gruppen af organofosfater, mens pirimicarb er et carbamat. Det betyder, at en af de undersøgte blandinger bestod af pesticider tilhørende samme kemiske gruppe, mens de to øvrige blandinger bestod af pesticider med grundlæggende forskellig kemisk struktur.

Alle de pesticider, som blev undersøgt i MCF7 celleproliferationsassayet, virker østrogen ved at aktivere ER, men et af pesticiderne, fenarimol, har flere samtidige virkningsmekanismer, idet det også påvirker enzymer involveret i omsætningen af steroidhormoner og pesticider (cytochrom P450 enzymer). Da MCF7 cellerne udtrykker disse enzymer, kan denne mekanisme spille en rolle for, at netop blandinger, hvor fenarimol indgår, udviser antagonisme.

De pesticider, som blev undersøgt i AR reporteragenassayet er alle i stand til at binde sig til og blokere AR. Selv om et af pesticiderne, prochloraz, kan påvirke en række enzymer, som vil have betydning for det samlede hormonforstyrrende respons *in vivo* (Vinggaard et al., 2000; Long et al., 2003), er det mindre sandsynligt, at denne mekanisme indvirker på responset i reporteragenassayet, som netop er udviklet til at detektere direkte interaktioner med hormonreceptoren. De blandinger, som er testet i AR reporteragenassayet, må derfor opfattes som pesticider med samme virkningsmekanisme.

I tabel 19 er resultaterne fra de 7 testsystemer sammenstillet med baggrund i resultaterne fra kapitel 5.

Tabel 19. Virkning af tokomponent blandinger med samme virkningsmekanisme på terrestriske planter (lugtløs kamille/alm. fuglegræs), akvatiske planter og alger, akvatiske bakterier (Microtox testen), dafnier, MCF7 celleproliferationsassayet og AR reporteragenassayet. A=additiv virkning; AN=antagonistisk virkning; S=synergistisk virkning.

	Terrestriske planter	Akvatiske planter	Alger	Akvatiske bakterier	Dafnie	MCF7 celleproliferationsassay	AR reporteragenassay
Metsulfuron+Triasulfuron	A/A	A	A				
MCPA+Meclopyrid	A/A	A					
Chlorfenvinphos+Dimethoat				A-S			
Chlorfenvinphos+Pirimicarb				A	A		
Dimethoat+Pirimicarb				A-S			
<i>o,p</i> -DDT+Endosulfan						A	
<i>o,p</i> -DDT+Methoxychlor						A	
Endosulfan+Fenarimol						A	
Fenarimol+Methoxychlor						AN	
Fenothrothion+Procymidon							A
Fenothrothion+Vinclozolin							A
Procymidon+Prochloraz							A-S
Procymidon+Vinclozolin							A
Prochloraz+Vinclozolin							A

Sammenfattende kan det konkluderes, at tokomponent blandinger bestående af pesticider med samme virkningsmekanisme i alt overvejende grad udviste additivitet, og at de forholdsvis få blandinger, som ikke virkede additivt, i alle tilfælde har virket antagonistisk. En entydig synergistisk effekt blev ikke observeret med denne kategori af pesticidblandinger. Blandinger bestående af pesticider tilhørende samme kemiske gruppe adskilte sig ikke i deres respons fra blandinger bestående af pesticider tilhørende forskellige kemiske grupper. Antallet af pesticidblandinger per testsystem varierer fra en for

alger til 5 for AR reporter-genassayet, hvilket gør det vanskeligt at sammenligne testsystemerne indbyrdes. Ovenstående konklusioner er derfor ikke baseret på nogen statistisk analyse af de enkelte testsystemer eller en statistisk sammenligning af disse men udelukkende på en overordnet vurdering af resultaterne.

Konklusionerne fra vores forsøg er i overensstemmelse med konklusionerne fra tidligere forsøg, hvor der blev påvist additivitet med tokomponent blandinger af pesticider med samme virkningsmekanisme (f.eks. Altenburger et al., 2003; Junghans et al., 2003a,b). Konklusionerne fra tidligere forsøg var imidlertid baseret primært på forsøg med alger og akvatiske bakterier, mens konklusionerne fra vores undersøgelser baserede sig på resultater med 7 forskellige testsystemer og organismer. Med baggrund i resultaterne fra nærværende projekt kan det konkluderes, at additivitet var hovedreglen, og antagonisme var undtagelsen, når pesticider med samme virkningsmekanisme virkede i kombination.

### 7.1.2 Pesticider med samme virkemåde og forskellige virkningsmekanismer

I forsøgene på terrestriske og akvatiske planter samt alger indgik i alt 6 tokomponent blandinger tilhørende denne kategori af blandinger. I de 4 øvrige testsystemer blev denne kategori af blanding ikke undersøgt. For alle 6 blandingers vedkommende var der tale om herbicider, som blokerer for planters og algers fotosyntese via dannelsen af reaktive iltradikaler, men årsagerne til den forøgede forekomst af iltradikaler i cellerne er forskellig (se afsnit 3.1). I tabel 20 er resultaterne for de 3 testsystemer sammenstillet

Tabel 20. Virkning af tokomponent blandinger med samme virkemåde men forskellige virkningsmekanismer på terrestriske planter (lugtløs kamille/alm. fuglegræs), akvatiske planter og alger. A=additiv virkning; AN=antagonistisk virkning.

	Terrestriske planter	Akvatiske planter	Alger
Aciflourfen+Diquat	A/A	A	AN
Aciflourfen+Mesotrion	A/A	AN	A
Aciflourfen+Terbuthylazin	A/A	A	A
Diquat+Mesotrion	AN/A	AN	A
Diquat+Terbuthylazin	A/A	A	AN
Mesotrion+Terbuthylazin	A/A	A	A

Af tabel 19 kan ses, at resultaterne med de 3 testsystemer ikke var sammenfaldende, idet der med 4 af de 6 blandinger er observeret afvigende resultater. Endvidere er der med enkelte af blandingerne divergerende resultater på de to terrestriske plantearter. Det er kun med aciflourfen+terbuthylazin og mesotrion+terbuthylazin, at der er registreret samme respons i alle 3 testsystemer.

Blandingen aciflourfen+diquat er undersøgt i Microtox testen, hvor der blev fundet en additiv effekt.

Med baggrund i de fundne resultater kan det konkluderes, at der med blandinger af herbicider med samme virkemåde men forskellige virkningsmekanismer blev fundet enten additivitet eller antagonisme i de 3 testsystemer, som blev anvendt til forsøg med denne kategori af blandinger. Denne konklusion blev underbygget af resultaterne fra forsøg på akvatiske bakterie med en enkelt af blandingerne. Antagonisme syntes at være et mere udbredt fænomen, end tilfældet var med blandinger af pesticider med samme virkningsmekanisme, men som for denne kategori blev der ikke registreret synergistiske vekselvirkninger med blandinger af pesticider med samme virkemåde.

### 7.1.3 Pesticider med forskellige virkemåder

Pesticider med forskellige virkemåder var den kategori af tokomponent blandinger, som der blev udført flest forsøg med. På terrestriske og akvatiske planter blev undersøgt i alt 9 herbicidblandinger, og 5 af disse blandinger blev ligeledes undersøgt på alger. Med Microtox testen og på dafnier blev undersøgt henholdsvis 14 og 11 forskellige blandinger af herbicider, fungicider og insekticider.

I tabel 21 er resultaterne på terrestriske planter, akvatiske planter samt alger sammenstillet.

Tabel 21. Virkning af tokomponent blandinger med forskellige virkemåder på terrestriske planter (lugtløs kamille/alm. fuglegræs), akvatiske planter og alger. A=additiv virkning; AN=antagonistisk virkning; - blandingen ikke undersøgt

	Terrestriske planter	Akvatiske planter	Alger
Glyphosat+Metsulfuron	A/A	A	A
Glyphosat+Terbuthylazin	AN/A	A	AN
Mechlorprop+Glyphosat	A/A	A	-
Mechlorprop+Metsulfuron	A/A	A	-
Mechlorprop+Terbuthylazin	A/A	AN	-
Mesotrion+Glyphosat	A/A	A	A
Mesotrion+Mechlorprop	A/A	AN	-
Mesotrion+Metsulfuron	A/AN	AN	A
Metsulfuron+Terbuthylazin	A/AN	AN	A

Af de 5 blandinger, som er undersøgt i alle 3 testsystemer, blev der observeret samme respons med to af blandingerne (glyphosat+metsulfuron og mesotrion+glyphosate), mens de 3 øvrige blandingers respons var divergerende. Sammenlignes de 9 blandinger, der blev undersøgt på både terrestriske og akvatiske planter, blev der fundet identiske resultater med 7 blandinger, såfremt et sammenfald i resultaterne mellem blot en af de terrestriske plantearter og *Lemna minor* vurderes som værende tilstrækkelig til, at responsen anses for at være ens. Forudsættes det, at responsen på begge terrestriske plantearter skulle være identisk med responsen på *Lemna minor*, var det 4 af de 9 blandinger, der virkede ens.

Det var ikke muligt at identificere noget mønster i resultaterne, som kunne indikere, at der med nogle af de undersøgte herbicider altid kunne forventes enten et additivt eller antagonistisk respons, når disse herbicider optræder i miljøet sammen med andre herbicider. På terrestriske og akvatiske planter var antagonisme mere almindeligt end additivitet, når mesotrion indgår i blandingerne, men dette var ikke tilfældet på alger. Aktiviteten af mesotrion var meget høj på terrestriske og akvatiske planter, med ED<sub>50</sub> doseringer på akvatiske planter i intervallet 10-30 µg l<sup>-1</sup>, hvorimod aktiviteten på alger var meget lav med ED<sub>50</sub> doseringer, som var op til 1000 gange højere. Denne markante forskel i testorganismernes følsomhed, og som følge heraf det meget forskellige forhold imellem herbiciderne i de blandinger med mesotrion, kunne være en medvirkende årsag til, at resultaterne på alger var forskellig fra resultaterne på terrestriske og akvatiske planter.

Responsen med blandinger af pesticider med forskellige virkemåder på terrestriske og akvatiske planter samt alger var sammenlignelig med responsen med pesticider med ens virkemåde med forskellige virkningsmekanismer, idet der er fundet additivitet eller antagonisme med samtlige blandinger, mens synergisme ikke blev observeret.

Resultaterne med Microtox testen og på dafnier var meget forskellige fra resultaterne på planter og alger, idet blandingerne virkede enten additivt eller synergistisk, og med to undtagelser blev der ikke fundet antagonistiske vekselvirkninger.

I tabel 22 er resultaterne fra forsøgene på akvatiske bakterier og dafnier sammenstillet. Syv blandinger blev undersøgt både på akvatiske bakterier og dafnier og som det fremgår af tabel 22, er resultaterne i to testsystemer meget sammenfaldende, idet det kun er med blandingen dimethoat+prochloraz, at der er fundet markant forskellige resultater.

Tabel 22. Virkning af tokomponent blandinger med forskellige virkemåder på akvatiske bakterier (Microtox testen) og dafnier. A=additiv virkning; AN=antagonistisk virkning; S=synergistisk virkning; - blandingen ikke undersøgt

	Akvatiske bakterier	Dafnier
Aciflourfen+Chlorfenvinphos	S	-
Aciflourfen+Dimethoat	A	-
Aciflourfen+Diquat	A	-
Aciflourfen+Prochloraz	A-S	-
Azoxystrobin+Chlorfenvinphos	A	A-AN
Azoxystrobin+Diquat	A-AN	-
Azoxystrobin+Esfenvalerat	-	A
Azoxystrobin+Pirimicarb	A	A
Axoxystrobin+Prochloraz	A-S	S
Chlorfenvinphos+Esfenvalerat	-	A
Chlorfenvinphos+Prochloraz	S	-
Dimethoat+Diquat	S	-
Dimethoat+Prochloraz	S	A
Diquat+Esfenvalerat	-	A
Diquat+Pirimicarb	A	A
Diquat+Prochloraz	S	S
Esfenvalerat+Pirimicarb	-	A
Esfenvalerat+Prochloraz	-	S
Pirimicarb+Prochloraz	A	-

På baggrund af resultaterne med det stort antal pesticidblandinger, der blev undersøgt i de 5 testsystemer, kan det konkluderes, at responsen med denne kategori af blandinger var mere uforudsigelig, end tilfældet var med de to øvrige blandingskategorier. Der blev observeret både additivitet, synergisme og antagonisme men med store forskelle imellem testsystemer. Mens der på terrestriske og akvatiske planter samt alger kun er fundet additivitet og antagonisme, som med de øvrige kategorier af blandinger, så blev der på akvatiske bakterier og dafnier fundet additivitet og synergisme.

Hvorvidt denne forskel var knyttet til testsystemerne, dvs. at sandsynligheden for synergistiske vekselvirkninger med pesticider var større over for bakterier og dafnier, end tilfældet var på planter og alger, og modsat at antagonisme var et fænomen, som optrådte hyppigere over for planter og alger end over for bakterier og dafnier, kan der kun gisnes om. Synergi over for bakterier og dafnier var i stor udstrækning knyttet til tilstedeværelsen af et specifikt pesticid i blandingerne nemlig prochloraz. Prochloraz har også i andre testsystemer forstærket effekten af andre pesticider, hvilket bl.a. er beskrevet i et review af Thompson (1996). Der er flere fysiologiske hypoteser bag denne tilsyneladende almene synergistiske effekt af prochloraz. En af dem er, at prochloraz kan hæmme enzymesystemer, der indgår i nedbrydningen af pesticider i organismer (Pilling et al. 1995; Thompson 1996; Wilkinson et al. 1973), men også en facilitering af pesticidoptagelsen gennem insekters kutikula er foreslået som årsagen til prochloraz synergistiske effekter (Chalvet-Monfray et al. 1996; Kennaugh et al. 1993). Blandinger af prochloraz og diquat har også været testet i både alge

og *Lemna* test-systemerne, og prochloraz og azoxystrobin har været testet på alger (upublicerede resultater). Men i ingen af disse forsøg blev der observeret synergistiske effekter, ligesom prochloraz heller ikke påvirkede toksiciteten af hverken metsulfuron-methyl eller terbuthylazin overfor *Lemna* (Cedergreen et al. 2004). Det tyder derfor på, at prochloraz kun virker som synergist i nogle organismer.

At man med ADM modellen har kunnet prediktere den maksimale effekt af de fleste af de undersøgte blandinger uanset pesticidernes virkemåde (med undtagelse af prochloraz), gør denne model til et interessant værktøj i en risikovurderingssammenhæng. Andre er tidligere nået til samme konklusion (bl.a. Backhaus et al., 2004; Faust & Scholz, 2004), men i forhold til tidligere undersøgelser er nærværende projekt baseret på et større antal testsystemer.

## 7.2 Trekomponent blandinger

I modsætning til tokomponent blandingerne blev trekomponent blandingerne ikke sammensat med udgangspunkt i de enkelte pesticiders virkemåde men derimod på baggrund af resultaterne med tokomponent blandingerne. Intentionen var at undersøge trekomponent blandinger, hvor de respektive tokomponent blandinger havde udvist forskellige respons. Som følge af de markante forskelle imellem testsystemerne var trekomponent blandingerne, der blev undersøgt på terrestriske og akvatiske planter samt med MCF7 celleproliferationsassayet og AR reporter-genassayet karakteriseret ved at være sammensat af pesticider, som i blanding to og to var enten additive eller antagonistiske. Modsat blev der i Microtox testen undersøgt trekomponent blandinger, hvor pesticiderne to og to udviste additivitet eller synergisme.

I tabel 23 er resultaterne med trekomponent blandinger på terrestriske og akvatiske planter sammenholdt med resultaterne af de respektive tokomponent blandinger.

Tabel 22. Virkning af trekomponent blandinger på terrestriske og akvatiske planter. I tabellen er der for hvert forsøg først angivet effekten af de 3 tokomponent blandinger (pesticid 1+2, 1+3 og 2+3) og efter lighedstegnet effekten af trekomponent blandingen (ED<sub>50</sub> niveau). A=additiv virkning; AN=antagonistisk virkning; S=synergistisk virkning

	Forsøg	Terrestriske planter	Akvatiske planter
Glyphosat+Metsulfuron+Mesotrion	1	A,A,A=AN	AN,AN,AN=AN
	2	A,A,AN=AN	AN,A,AN=AN
Glyphosat+Mechlorprop+Terbuthylazin	1	A,A,A=A	A,AN,AN=AN
	2	A,A,S=A	AN,AN,AN=AN
Glyphosat+Mechlorprop+Mesotrion	1	A,A,A=A-AN	
	2	A,A,A=AN	
Aciflourfen+Mesotrion+Terbuthylazin	1	A,AN,A=A	
	2	AN,A,S=A	
Terbuthylazin+Mesotrion+Mechlorprop	1		AN,A,AN=AN
	2		AN,A,AN=AN
Diquat+Aciflourfen+Mesotrion	1		A,AN,A=AN
	2		AN,AN,A=AN

På terrestriske planter blev der med de respektive tokomponent blandinger i de fleste tilfælde fundet additive effekter. Det var ikke muligt med udgangspunkt i et kendskab til effekten af tokomponent blandingerne at forudsige effekten af trekomponent blandingerne. Således er der fundet en

antagonistisk effekt i tilfælde, hvor samtlige tokomponent blandinger udviste additivitet (glyphosat+metsulfuron+mesotrion), ligesom der er eksempler på additive effekter af trekomponent blandingerne, hvor effekten af en af tokomponent blandingerne ikke var additiv (aciflourfen+mesotrion+terbuthylazin). På akvatiske planter er der observeret antagonisme med samtlige trekomponent blandinger i begge forsøg, hvilket var i overensstemmelse med, at der med undtagelse af et enkelt forsøg blev fundet antagonisme med minimum to af respektive tokomponent blandinger.

Som tilfældet var med tokomponent blandinger er der observeret et helt andet respons på akvatiske bakterier end på de undersøgte plantearter, idet additivitet og synergisme var hyppigere end antagonisme (Tabel 24).

Tabel 24. Virkning af trekomponent blandinger på akvatiske bakterier (Microtox test). I tabellen er for hvert forsøg først angivet effekten af de 3 tokomponent blandinger (pesticid 1+2, 1+3 og 2+3) og derefter effekten af trekomponent blandingen (ED<sub>25</sub> niveau). A=additiv virkning; AN=antagonistisk virkning; S=synergistisk virkning

	Akvatiske bakterier
Aciflourfen+Dimethoat+Diquat	S,A,S=A-S
Aciflourfen+Dimethoat+Prochloraz	A,A,S=A
Aciflourfen+Diquat+Prochloraz	A,S,S=S
Azoxystrobin+Diquat+Pirimicarb	A,A,A=A-AN
Azoxystrobin+Diquat+Prochloraz	A,A,S=S
Chlorfenvinphos+Dimethoat+Prochloraz	S,S,S=S
Dimethoat+Diquat+Prochloraz	A,S,S=S
Diquat+Pirimicarb+Prochloraz	A,A,A=A

For 6 af de 8 blandingers vedkommende blev der påvist synergi for mindst én af tokomponent blandingerne, og for 5 af disse 6 blandinger er der ligeledes påvist synergi med trekomponent blandingerne. For de resterende 2 trekomponent blandingers vedkommende blev der fundet additivitet med alle 3 tokomponent blandinger, og disse to trekomponent blandingers effekt var også additiv, og for den ene blandings vedkommende svagt antagonistisk.

Udover at responsen på akvatiske bakterier adskiller sig fra responsen på terrestriske og akvatiske planter, så syntes effekten af trekomponent blandinger også i højere grad at kunne predikteres ud fra en viden om tokomponent blandingerne respons. Hvis én af tokomponent blandingerne udviste synergi, var der stor sandsynlighed for at også trekomponent blandingen var synergistisk, mens additivitet var det mest sandsynlige resultat, hvis tokomponent blandingerne alle udviste additivitet.

Trekomponent blandingerne, som blev undersøgt med henholdsvis MCF7 celleprofilerationsassayet og AR reportergenassayet, udviste nogen forskel i deres respons (Tabel 25).

Tabel 25. Virkning af trekomponent blandinger i et MCF7 celleprofilerationsassay og et AR receptorgenassay. I tabellen er for hvert forsøg først angivet effekten af de 3 tokomponent blandinger (pesticid 1+2, 1+3 og 2+3) og derefter effekten af trekomponent blandingen (ED<sub>50</sub> niveau). A=additiv virkning; AN=antagonistisk virkning; S=synergistisk virkning

	MCF7 celleprofilerationsassay	AR reportergenassay
<i>o,p</i> -DDT+Methoxychlor+Endosulfan	A,S,A=A	
Methoxychlor+Endosulfan+Fenarimol	A,A,AN=AN	
Vinclozolin+Procymidon+Fenitrothion		A,A,A=A
Vinclozolin+Procymidon+Prochloraz		A,A,A=AN

Som det fremgår af tabel 25, var det vanskeligt at drage konklusioner vedrørende trekomponent blandingers effekt med udgangspunkt i effekten af de respektive tokomponent blandinger. Med MCF7 celleprofilerationsassayet blev der fundet en additiv effekt, hvor en af tokomponent blandingerne virkede synergistisk, mens forekomsten af en tokomponent blanding med antagonistisk virkning resulterede i en antagonistisk vekselvirkning med trekomponent blandingen. Den antagonistiske virkning skyldes sandsynligvis fenarimol, der har flere forskellige virkningsmekanismer (se afsnit 6.4.3). Med AR reportergenassayet blev der fundet additivitet med samtlige tokomponent blandinger, alligevel var effekten af en af trekomponent blandingerne antagonistisk.

Sammenfattende kan det konkluderes, at som for tokomponent blandingerne var additivitet og antagonisme det mest sandsynlige respons, når terrestriske og akvatiske planter blev eksponeret for blandinger af 3 pesticider, idet synergi var et sjældent forekommende fænomen. Samme konklusion kunne drages med hensyn til MCF7 celleprofilerationsassayet og AR reportergenassayet, hvorimod additivitet eller synergi var det mest sandsynlige udfald med Microtox testen. Med undtagelsen af Microtox testen, hvor der syntes at være en vis sammenhæng imellem effekten af trekomponent blandinger og de respektive tokomponent blandinger, så var det ikke muligt at prediktere effekten af trekomponent blandinger på baggrund af en *a priori* viden om tokomponent blandingeres respons. Vi har ikke kendskab til, at der tidligere er udført systematiske sammenhørende undersøgelser med to- og trekomponent blandinger, og vores resultaterne kan derfor ikke sammenholdes med resultater fra tidligere undersøgelser.



## 8 Perspektivering

Nærværende projekt er det første, hvor kombinationseffekter af pesticider er blevet undersøgt i forskellige testsystemer, og hvor det primære formål har været at sammenholde resultaterne fra de enkelte testsystemer. Baggrunden for projektet var, at der på trods af en stor interesse omkring effekter af såkaldte "cocktails" af pesticider og andre miljøfremmede stoffer ikke er konsensus om referencemodel og terminologi. Følgelig er det ofte vanskeligt at sammenholde resultater fra forskellige undersøgelser, hvilket også det gennemførte litteraturstudium klart illustrerer. I dette projekt er anvendt samme referencemodel og statistiske tilgang ved analysen af resultaterne fra de 7 testsystemer.

Der er i de senere år hyppigt blevet fremført, at kombinationseffekter af miljøfremmede stoffer burde inddrages i risikovurderingen i erkendelse af, at mennesker, dyr og non-target organismer i de terrestriske og akvatiske miljø ofte vil eksponeres for mere end ét stof ad gangen. En tilsvarende problemstilling gælder for pesticider, som meget ofte udsprøjtes i blanding med andre pesticider. I nyhedsmedierne dukker diskussionen om kombinationseffekter af pesticider og andre "miljøgifte" op fra tid til anden. Ved kombinationseffekter forstås der i denne sammenhæng som oftest uventede høje effekter, eller hvad der med et fagligt udtryk kaldes synergi. Ofte er denne diskussion foranlediget af enkeltstående resultater, som der endvidere ikke altid er statistisk belæg for. På trods heraf drages der ind imellem generelle konklusioner, som typisk peger i retning af, at når der er observeret synergi i ét tilfælde, så kan det ikke udelukkes, at synergi er et mere generelt forekommende fænomen ved samtidig eksponering for to eller flere pesticider.

Selv for en velafgrænset gruppe af miljøfremmede stoffer som pesticiderne, er det i praksis ikke overkommeligt at undersøge effekten af alle relevante kombinationer. Modsat mange andre miljøfremmede stoffer er pesticiders virkningsmekanisme og virkemåde kendt. Udgangspunktet for projektet var derfor at undersøge, om man med baggrund i denne viden kan opstille generelle retningslinier, som vil kunne bruges til at identificere de kombinationer af pesticider, hvor risikoen for synergi er størst. Såfremt det er muligt, vil det være en betydelig mere overkommelig opgave at risikovurdere realistiske anvendelsesscenarier for nye pesticider, herunder at identificere pesticidkombinationer, som potentielt kunne udgøre et problem, og som man derfor kunne kræve undersøgt eksperimentelt.

### 8.1 Human- versus økotoksikologi

I dette projekt har vi anvendt 5 økotoksikologiske testsystemer, mens vi inden for det humantoksikologiske område kun har inddraget 2 testsystemer. Dette valg var betinget af, at en forudsætning for at kunne gennemføre det store antal forsøg, som var nødvendig for at opfylde projektets mål var, at de anvendte metoder var billige og hurtige. Inden for det økotoksikologiske områder eksisterer der en række metoder, som opfylder disse krav, og som

anvendes rutinemæssigt. Det er imidlertid ikke tilfældet inden for det humantoksikologiske område.

Det er i dag almindelig praksis inden for det økotoksikologiske område at vurdere effekten af pesticidblandinger på basis af doseringer, som giver et bestemt biologisk respons. Det er ikke altid tilfældet inden for det humantoksikologiske område, hvor "no observable adverse effect level" (NOAEL) ofte er udgangspunkt for vurderingen af pesticidkombinationer. I et review omhandlende toksikologiske effekter af kemiske stoffer konkluderes det, at ideelt bør udgangspunktet for vurderingen være en dosis, der er associeret med et bestemt biologisk respons, da NOEL er en enkelt punktværdi og ikke et mål for et biologisk respons, og dets størrelse afhænger i høj grad af det eksperimentelle design (FødevarerRapport 2003:12). De data, der er tilgængelige for de fleste kemiske stoffer tillader imidlertid ikke altid en estimering af ED doseringer, og relative potenser må derfor baseres på NOAEL som udgangspunkt.

Mens diskussionen indenfor det økotoksikologiske område har været meget fokuseret på valg af referencemodel, så har der indenfor det humantoksikologiske område i højere været en accept af teorien om at "nul plus nul er nul". Dette afspejles hos Cassee et al. (1998) og Feron & Groten (2002), som opsummerede resultaterne af 15 års forskning ved deres institutioner med kombinationer af kemiske stoffer. De konkluderede 1) at kombinationseffekter observeret ved høje doseringer ikke korresponderede med effekter observeret ved lave doseringer, 2) at ADM er en velegnet metode til analyse af blandinger af stoffer med samme virkemåde og 3) at eksponering til ikke-toksiske lave doseringer af blandinger af stoffer med forskellige virkemåder ikke udfør et forøget risiko sammenlignet med eksponering til enkeltstoffer i lave doseringer, dvs. sundhedsrisikoen af sådanne blandinger er bestemt af sundhedsrisikoen af det mest toksiske stof.

I dag er hverken inden for det øko- eller humantoksikologiske område krav om, at ved risikovurderinger af pesticider skal tages hensyn til kombinationseffekter. I den nye EU forordning nr. 396/2005 om maksimalgrænseværdier for pesticidrester i eller på vegetabiliske og animalske fødevarer og foderstoffer og om ændring af Rådets direktiv 91/414/EØF er det imidlertid i præambelen nævnt, at det er vigtigt at gøre en yderligere indsats for at udvikle en metodologi, der tager hensyn til kumulative og synergistiske virkninger, og senere i forordningen er det nævnt, at Kommissionen, når den fremsætter forslag om maksimalgrænseværdier, bl.a. skal tage hensyn til stoffernes kumulative og synergistiske effekter, når der findes metoder til vurdering af sådanne virkninger (artikel 14, stk. 2).

Det har været foreslået at anvende et såkaldt "hazard index", som er lig summen af eksponeringen af de enkelte pesticider i forhold til deres respektive ADI ( $E_1/ADI_1 + E_2/ADI_2 + \dots$ ), som udgangspunkt for vurderingen af f.eks. pesticidblandinger. Hvis stofferne i blandingen har samme virkningsmekanisme bør TEF (Toksikologiske Ækvivalens Faktorer) i stedet benyttes, hvilket i princippet svarer til anvendelsen af ADM modellen (Reffstrup, 2002). Fødevarestyrelsen konkluderede i sin rapport (FødevarerRapport 2003:12), at rigid anvendelse af en enkelt, særligt udvalgt metode til risikovurdering af alle blandinger af kemiske stoffer ikke kunne anbefales. Det blev foreslået, at fremgangsmåden beskrevet af Reffstrup (2002) kunne bruges til vurdering af relativt simple blandinger af

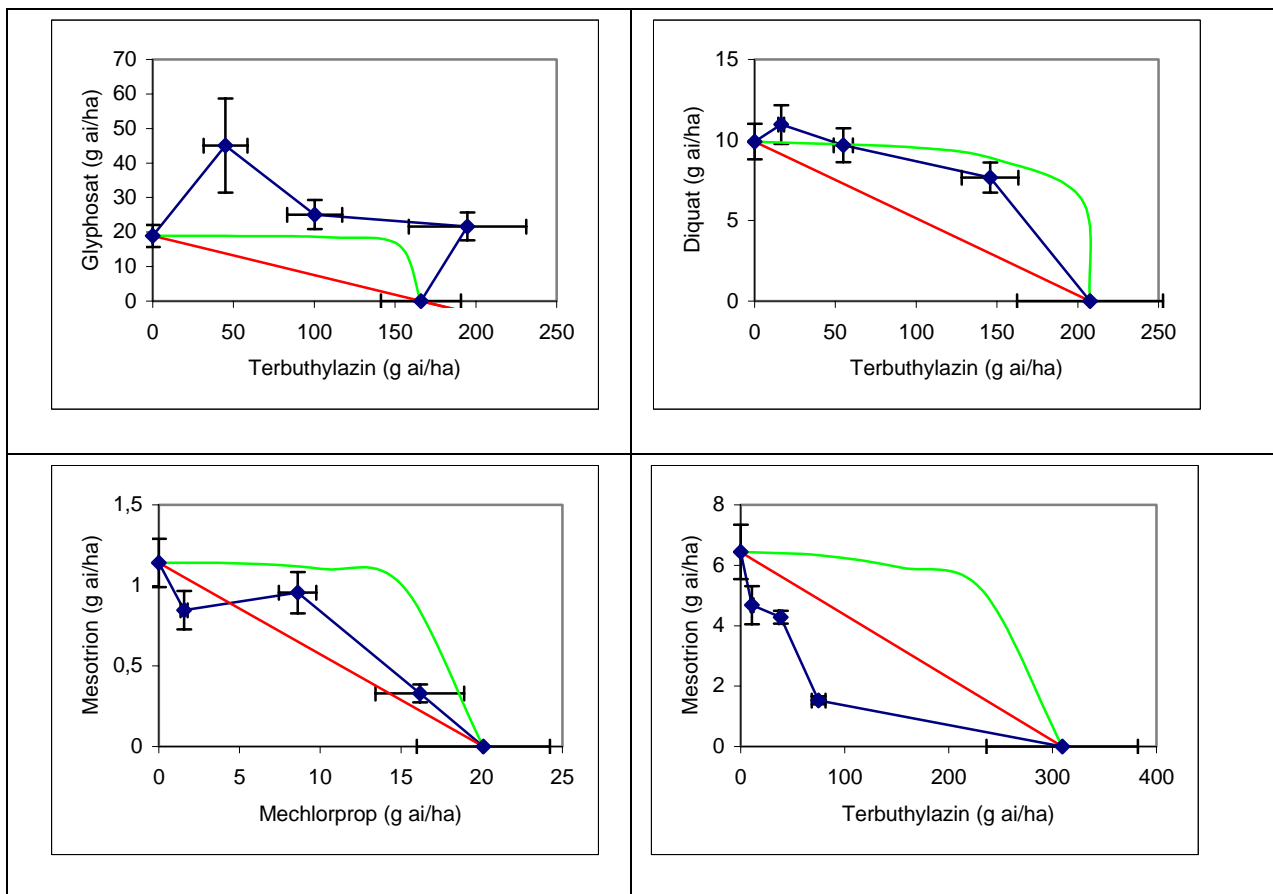
pesticidrester i fødevarer, mens andre metoder burde foretrækkes, når der er tale om mere komplekse blandinger (Groten *et al.* 2001 og ATSDR 2002).

## 8.2 ADM versus MSM

Sideløbende med nærværende projekt blev der som led i et EU projekt (BEAM) udført en række undersøgelser med multikomponentblandinger af kemiske stoffer med identiske eller forskellige virkemåder af to forskergrupper ved universiteterne i henholdsvis Bremen og Leipzig. Et af de primære formål med dette projekt var at undersøge, hvilken af de to referencemodeller, ADM og MSM, som mest præcist kunne prediktere effekterne af multikomponentblandingerne undersøgt primært på alger men også akvatiske bakterier, dafnier og fisk. Forsøgene viste, at ADM modellen var bedst til at beskrive effekten af blandinger af kemiske stoffer med samme virkemåde, mens MSM som oftest beskrev blandinger af kemiske stoffer med forskellige virkemåder mere præcist (Altenburger *et al.*, 2000; Backhaus *et al.*, 2000; Drost *et al.*, 2003; Faust *et al.*, 2001; Faust *et al.*, 2003; Junghans *et al.*, 2003b; Junghans *et al.*, 2003a). Som oftest predikterede ADM en større effekt af multikomponentblandingerne end MSM, men for blandinger af stoffer med en meget flad doseringskurve kunne forholdet være omvendt, eller også var der ikke forskel på de to referencemodellers prediktioner (Faust & Scholze, 2004). Generelt var forskellen mellem de to referencemodeller uden praktisk betydning i en risikovurderingssammenhæng, og derfor anbefalede forfatterne, at ADM burde anvendes som referencemodell ved en fremtidig risikovurdering af blandinger af miljøfremmede stoffer. Det skal bemærkes, at tidligere undersøgelser af de samme to forskergrupper med tokomponentblandinger ikke viste samme entydige sammenhæng. Tværtimod fandt man, at ADM generelt beskrev effekten af binære blandinger bedre end MSM (Faust *et al.*, 1993, 1994, Grimme *et al.*, 1996).

I nærværende projekts første fase blev samtlige resultater med tokomponent blandinger på terrestriske og akvatiske planter samt alger analyseret vha. af både ADM og MSM. I alle tilfælde predikterede ADM en højere effekt end MSM, hvilket kan forklares med, at ingen af de undersøgte herbicider havde så flade doseringskurver, at MSM kunne forventes at prediktere højere effekter end ADM.

Dette er illustreret i figur 44 for 4 udvalgte tokomponentblandinger på alm. fuglegræs og lugtløs kamille, hvor MSM i alle tilfælde predikterede en lavere effekt end ADM. Af figur 44 kan endvidere ses, at det faktum, at ADM i de fleste tilfælde predikterer højere effekter af pesticidblandinger end MSM, betyder, at synergi vil være hyppigere forekommende, hvis MSM anvendes som referencemodell, mens antagonisme vil være mere sandsynlig, når ADM anvendes. De 4 blandinger i figur 44 illustrerer dette forhold. Blandingen glyphosat+terbuthylazin udviste så stor grad af antagonisme, at uanset hvilken referencemodell, der er anvendt, vil konklusionen være, at denne blanding er antagonistisk. Modsat forholder det sig med blandingen diquat+terbuthylazin, hvor responset var, som predikteret med MSM, mens der i følge ADM var tydelig antagonisme. Blandingerne mesotrion+mechlorprop repræsenterer et eksempel på en blanding, som i følge MSM er synergistisk, men som følger ADM og derfor vurderes som værende additiv. Mesotrion+terbuthylazin eksemplificerer et eksempel på en blanding, som er synergistisk i følge både ADM og MSM.



Figur 44. Eksempler på respons af tokomponentblandinger på alm. fuglegræs og lugtløs kamille. De røde og grønne linier repræsenterer henholdsvis ADM og MSM ED<sub>50</sub> isobolerne, mens de sorte punkter illustrerer de estimerede ED<sub>50</sub> doseringer af tokomponentblandinger af de to herbicider med angivelse af standardafvigelser.

Anvendes ADM som referencemodel ved risikovurdering af pesticidblandinger vil der være færre situationer, hvor effekten undervurderes, end hvis MSM anvendes. Spørgsmålet er så, om ADM kan betragtes som et slags "worst-case" scenario, eller om der vil være blandinger, som resulterer i større effekter end predikeret med denne model, og om disse blandinger kan identificeres på grundlag af et kendskab til pesticidernes virkningsmekanisme/virkemåde. Dette spørgsmål er søgt besvaret i dette projekt.

En fordel ved ADM frem for MSM metoden er, at man med kendskab til ED/EC<sub>50</sub> værdierne for de enkelte pesticider samt nogle antagelser omkring doseringskurvens form er i stand til at vurdere, om det er sandsynligt, at blandinger af disse pesticider vil resultere i utilsigtede effekter. Cedergreen et al. (2003) har vist, hvordan ADM modellen kan bruges til at vurdere effekterne af pesticidblandinger.

### 8.3 Kombinationseffekter af tokomponent og trekomponent blandinger

Med tokomponentblandinger af pesticider med samme virkningsmekanisme blev der i alle testsystemer fundet en klar indikation på, at effekten af disse blandinger kunne predikeres vha. ADM, og der blev ikke observeret entydige synergistiske effekter med nogen af de 20 undersøgte kombinationer. Tokomponentblandinger af pesticider med samme virkemåde men forskellige virkningsmekanismer blev kun undersøgt på terrestriske og

akvatiske planter samt alger. I de fleste tilfælde fulgte blandingerne ADM, men der blev også observeret antagonisme. Synergi blev ikke observeret med nogen af de 6 blandinger. Resultaterne på terrestriske og akvatiske planter samt alger med tokomponentblandinger af pesticider med forskellige virkemåder var identiske med resultaterne med blandinger af pesticider med samme virkemåde og forskellige virkningsmekanismer, idet der i intet tilfælde blev observeret synergi. I testsystemerne med akvatiske bakterier og dafnier blev der observeret et noget andet mønster, idet additivitet og synergi var de mest almindelige respons, mens entydige antagonistiske respons ikke blev observeret. Synergi var i vid udstrækning knyttet til tilstedeværelsen af prochloraz, hvilket er i overensstemmelse med tidligere undersøgelser.

Sammenfattende kan det konkluderes, at der i forsøgene med tokomponent blandinger kun er observeret meget få tilfælde, hvor effekten af tokomponentblandinger var højere end den forventede effekt i følge ADM. Konkret er der i dette projekt undersøgt 101 forskellige kombinationer af pesticidblandinger og testsystemer. Hovedparten af disse blandinger fulgte ADM, og kun i 8 tilfælde er der fundet et entydigt synergistisk respons. I disse tilfælde varierede de estimerede  $\lambda$  værdier mellem 2 og 3, dvs. der med en 50:50 blanding er opnået f.eks. 50% effekt med fra 25 til 50% af den i følge ADM forventede dosering.

Det faktum, at der er observeret signifikante synergistiske effekter i forhold til ADM, betyder, at ADM ikke umiddelbart kan anvendes som et "worst case" scenario, men at ADM f.eks. må kombineres med anvendelse af en sikkerhedsfaktor, som også tidligere påpeget af Faust & Scholz (2004).

Antagonisme blev observeret med 14 af de 101 blandinger. I de tilfælde, hvor det var muligt at estimerede  $\lambda$  værdier, varierede disse fra 0.20 til 0.58, dvs. den observerede antagonisme svarede til, at det var nødvendigt at øge doseringen af de to pesticider i en 50:50 blanding med fra 34 ( $2^{1-0.58}$ ) til 74% ( $2^{1-0.2}$ ). I de tilfælde, hvor det ikke var muligt at estimere  $\lambda$ , eller hvor model 3 blev anvendt, var graden af antagonisme endnu større.

Trekomponent blandingerne var sammensat med udgangspunkt i resultaterne med tokomponent blandinger. Baggrunden var, at formålet med disse forsøg var at undersøge, om det var muligt at prediktere effekten af trekomponentblandinger med baggrund i et forhåndskendskab til effekten af tokomponentblandinger.

Det var hverken på terrestriske eller akvatiske planter muligt at identificere noget mønster imellem de respektive tokomponent blandingers respons og trekomponent blandingsens respons. En tilsvarende konklusion kunne drages vedrørende MCF7 celleproliferations- og AR reportergenassayene. I modsætning til terrestriske og akvatiske planter, så syntes effekten af trekomponent blandinger på akvatiske bakterier i højere grad at kunne predikteres ud fra en viden om tokomponent blandingeres virkning. Om det generelt er tilfældet i dette testsystem eller primært er knyttet til trekomponent blandinger, hvor der er observeret synergi er ikke muligt at afgøre på grundlag af de foreliggende resultater.

Sammenfattende kan det konkluderes, at med undtagelse af når prochloraz indgik i trekomponentblandinger på akvatiske bakterier, så var det ikke muligt, med udgangspunkt i de respektive tokomponent blandingers respons, at drage nogen entydige konklusioner vedrørende trekomponent

blandingers respons. Med undtagelse af de blandinger, som er undersøgt i MCF7 celleproliferationsassayet og AR reporteragenassayet, repræsenterer alle undersøgte trekomponent blandinger eksempler på blandinger af pesticider med forskellige virkemåder. Såfremt denne type blandinger beskrives bedre med MSM end med ADM ville man forvente antagonisme, når ADM anvendes som referencemodel. Det er imidlertid ikke tilfældet, idet mange af de undersøgte trekomponentblandinger virkede additivt eller synergistisk, dvs. de heller ikke fulgte MSM. Det kan derfor konkluderes at ADM også synes at være en mere velegnet referencemodel end MSM ved vurdering af kombinationseffekter af trekomponent blandinger af pesticider.

Svaret på spørgsmålet om, hvorvidt ADM kan betragtes som et slags "worst-case" scenario, er derfor et ja, idet projektets resultater har vist, at denne model kun meget sjældent undervurderede effekten af tokomponent blandinger. Som et værktøj til risikovurdering af tokomponent blandinger er ADM derfor mere velegnet end MSM modellen uagtet.

#### 8.4 Sammenligning af testsystemer

Med undtagelse af forsøgene på terrestriske planter anvendes de øvrige økotoxikologiske testsystemer rutinemæssigt ved vurderingen af pesticiders økotoxikologiske effekter. MCF7-celleproliferationsassayet og AR reporteragenassayet er forholdsvis nye test, som endnu ikke anvendes rutinemæssigt ved vurdering af de humantoksikologiske effekter af pesticider. I nogle af testsystemerne er der anvendt de samme pesticidblandinger for at kunne vurdere i hvor stor udstrækning resultater i et testsystem kan ekstrapoleres til andre testsystemer. Af speciel interesse er sammenligningen mellem terrestriske og akvatiske planter og til dels også sammenligningen mellem disse to testsystemer og alger. At førstnævnte sammenligning er interessant skyldes, at der i fremtiden forventes, at der vil blive stillet krav om dokumentation af effekten af pesticider på terrestriske non-target planter, hvilket ikke er et krav i dag.

En sammenligning af resultaterne med de samme herbicidblandinger på lugtløs kamille, alm. fuglegræs og *Lemna minor* viser en meget stor grad af overensstemmelse. Med 11 og 13 af de i alt 17 herbicidblandinger er der fundet identiske respons på henholdsvis lugtløs kamille og *Lemna minor* og alm. fuglegræs og *Lemna minor*. I ingen af de øvrige tilfælde er der observeret diametralt modsatte resultater, dvs. henholdsvis antagonisme og synergisme. Det betyder, at resultater med tokomponentblandinger fra forsøg på akvatiske planter vil kunne danne grundlag for en vurdering af kombinationseffekter på terrestriske planter og omvendt. Dette resultat er lidt overraskende, da rangordningen af de undersøgte herbicider over for terrestriske planter er forskellig fra rangordningen over for *Lemna minor* (Figur 7 & 15). Endvidere er de absolutte forskellene imellem de mest og mindst aktive herbicider større på *Lemna minor* (en faktor 100.000) end på terrestriske planter (en faktor 1000), hvilket betyder, at forholdet imellem herbiciderne i mange af de undersøgte blandinger har været forskelligt.

Der blev ligeledes fundet en forholdsvis god overensstemmelse mellem terrestriske planter og alger, idet responsen af 9 og 7 af de i alt 12 herbicidblandinger var identiske på henholdsvis lugtløs kamille og alger og alm. fuglegræs og alger. Der var dog typisk tale om andre herbicidblandinger end for terrestriske og akvatiske planter, hvilket afspejler, at der var en forholdsvis dårlig overensstemmelse mellem resultaterne med akvatiske planter og alger. Modsat højere planter er alger encellede organismer, og

algers respons over for herbicider kan være meget forskelligt fra planter. Det gælder f.eks. over for phenoxysyre herbiciderne, der påvirker kommunikationen mellem cellerne i højere planter. Phenoxysyrers aktivitet er meget lavere overfor alger end over for planter. At potensen af svage syrer som metsulfuron og triasulfuron i forhold til neutrale herbicider som terbuthylazin er meget lavere for alger end for *Lemna minor* afspejler, at dyrkningsmediets pH, som var 5 i *Lemna minor* testen og 8 i algetesten, har stor indflydelse på optagelsen af svage syrer (Figur 15 & 18).

Som det var tilfældet med terrestriske og akvatiske planter samt alger, så er der ligeledes undersøgt en række identiske pesticidblandinger på akvatiske bakterier og dafnier. Generelt er der fundet en meget stor overensstemmelse imellem resultaterne i disse to testsystemer, idet det kun med én af de 8 blandinger (dimethoat+prochloraz) er fundet forskellige respons, hvilket tyder på, at det i vid udstrækning er muligt at ekstrapolere imellem disse to testsystemer mht. pesticidblandingers respons.

I de to testsystemer, der anvendes til vurdering af kemiske stoffers hormonforstyrrende effekter, er der anvendt forskellige pesticidblandinger, da det blev prioriteret at udvælge nogle af de mest potente pesticider i hvert testsystem. I begge testsystemer er der overvejende observeret additive effekter, hvilket er i overensstemmelse med tidligere undersøgelser. At der med et enkelt pesticid er observeret antagonistiske respons i MCF7 celleproliferationsassayet er ligeledes i overensstemmelse med nyere resultater fra andre studier (Rajapakse et al., 2004).

Sammenfattende kan det konkluderes, at det ved vurdering af kombinationseffekter af pesticider synes muligt at ekstrapolere imellem sammenlignelige testorganismer og testsystemer, i dette projekt eksemplificeret ved terrestriske planter/akvatiske planter/alger, akvatiske bakterier/dafnier og MCF7 celleproliferationsassayet/AR reporter genassayet.

I dette projekt har vi anvendt 5 økotoksikologiske testsystemer, mens vi inden for det humantoksikologiske område kun har inddraget 2 testsystemer. Dette valg var betinget af, at en forudsætning for at kunne gennemføre det store antal forsøg, som var nødvendig for at opfylde projektets mål var, at de anvendte metoder var billige og hurtige. Inden for det økotoksikologiske områder eksisterer der en række metoder, som opfylder disse krav, og som anvendes rutinemæssigt. Det er imidlertid ikke tilfældet inden for det humantoksikologiske område.

Det er i dag almindelig praksis inden for det økotoksikologiske område at vurdere effekten af pesticidblandinger på basis af doseringer, som giver et bestemt biologisk respons. Det er ikke altid tilfældet inden for det humantoksikologiske område, hvor "no observable adverse effect level" (NOAEL) ofte er udgangspunkt for vurderingen af pesticidkombinationer. I et review omhandlende toksikologiske effekter af kemiske stoffer konkluderes det, at ideelt bør udgangspunktet for vurderingen være en dosis, der er associeret med et bestemt biologisk respons, da NOEL er en enkelt punktverdi og ikke et mål for et biologisk respons, og dets størrelse afhænger i høj grad af det eksperimentelle design (Fødevarerapport 2003:12). De data, der er tilgængelige for de fleste kemiske stoffer tillader imidlertid ikke altid en estimering af ED doseringer, og relative potenser må derfor baseres på NOAEL som udgangspunkt.

Mens diskussionen indenfor det økotoksikologiske område har være meget fokuseret på valg af referencemodel, så har der indenfor det humantoksikologiske område i højere været en accept af teorien om at "nul plus nul er nul". Dette afspejles hos Cassee et al. (1998) og Feron & Groten (2002), som opsummerede resultaterne af 15 års forskning ved deres institutioner med kombinationer af kemiske stoffer. De konkluderede 1) at kombinationseffekter observeret ved høje doseringer ikke korresponderede med effekter observeret ved lave doseringer, 2) at ADM er en velegnet metode til analyse af blandinger af stoffer med samme virkemåde og 3) at eksponering til ikke-toksiske lave doseringer af blandinger af stoffer med forskellige virkemåder ikke udfør et forøget risiko sammenlignet med eksponering til enkeltstoffer i lave doseringer, dvs. sundhedsrisikoen af sådanne blandinger er bestemt af sundhedsrisikoen af det mest toksiske stof.

I dag er hverken inden for det øko- eller humantoksikologiske område krav om, at ved risikovurderinger af pesticider skal tages hensyn til kombinationseffekter. I den nye EU forordning nr. 396/2005 om maksimalgrænseværdier for pesticidrester i eller på vegetabiliske og animalske fødevarer og foderstoffer og om ændring af Rådets direktiv 91/414/EØF er det imidlertid i præambelen nævnt, at det er vigtigt at gøre en yderligere indsats for at udvikle en metodologi, der tager hensyn til kumulative og synergistiske virkninger, og senere i forordningen er det nævnt, at Kommissionen, når den fremsætter forslag om maksimalgrænseværdier, bl.a. skal tage hensyn til stoffernes kumulative og synergistiske effekter, når der findes metoder til vurdering af sådanne virkninger (artikel 14, stk. 2).

Det har været foreslået at anvende et såkaldt "hazard index", som er lig summen af eksponeringen af de enkelte pesticider i forhold til deres respektive ADI ( $E_1/ADI_1 + E_2/ADI_2 + \dots$ ), som udgangspunkt for vurderingen af f.eks. pesticidblandinger. Hvis stofferne i blandingen har samme virkningsmekanisme bør TEF (Toksikologiske Ækvivalens Faktorer) i stedet benyttes, hvilket i princippet svarer til anvendelsen af ADM modellen (Reffstrup, 2002). Fødevarestyrelsen konkluderede i sin rapport (FødevareRapport 2003:12), at rigid anvendelse af en enkelt, særligt udvalgt metode til risikovurdering af alle blandinger af kemiske stoffer ikke kunne anbefales. Det blev foreslået, at fremgangsmåden beskrevet af Reffstrup (2002) kunne bruges til vurdering af relativt simple blandinger af pesticidrester i fødevarer, mens andre metoder burde foretrækkes, når der er tale om mere komplekse blandinger (Groten *et al.* 2001 og ATSDR 2002).



## 9 Referencer

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. *Environmental toxicology and Chemistry* 19, 2341-2347.

Altenburger R, Nenza M, Schüürmann G 2003. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. *Environmental toxicology and Chemistry* 22, 1900-1915.

Andersen H R, Andersson AM, Arnold SF, Autrup H, Barfoed M, Beresford, NA, Bjerregaard P, Christiansen LB, Gissel B, Hummel R, Jorgensen ECB, Korsgaard B, Le Guvel R, Leffers H, McLachlan JA, Moeller A, Nielsen JB, Olea N, Oles-Karasko A, Pakdel F, Pedersen KL, Perez P, Skakkebæk NE, Sonnenschein C, Soto AM, Sumpter JP, Thorpe SM, Grandjean P 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* 107, 89-108.

Andersen HR., Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermansen IM, Bonfeld-Jorgensen EC 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179, 1-12.

ATSDR (2002). Guidance manual for the assessment of joint toxic action of chemical mixtures. Draft for public comment February 2002. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency of Toxic Substances and Disease Registry, Division of Toxicology, Atlanta, U.S.A.

Backhaus T, Altenburger R, Boedeker W, Faust M, Scholze M, Grimme L H 2000. Predictability of the toxicity of multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio Fischeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2348-2356.

Backhaus T, Altenburger R, Arrhenius Å, Blanck H, Faust M, Finizio A, Gramatica P, Grote M, Junghans M, Meyer W, Pavan M, Porsbring T, Scholze M, Todeschini R, Vighi M, Walter H, Grimme LH. 2003. The BEAM-project: prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. *Continental Shelf Research* 23: 1757-1769.

Backhaus T, Faust M, Scholze M, Gramatica P, Vighi M, Grimme L H 2004. Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 258-264.

Bates DM, Watts DG 1988. Nonlinear regression analysis and its applications. Wiley & sons, New York, U.S.A.

- Birkhøj M, Nellemann C, Jarfelt K, Jacobsen H, Andersen HR, Vinggaard AM. 2004. The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 201, 10-20.
- Cassee FR, Groten JP, Bladeren PJ van, Feron VJ 1998. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Critical Reviews in Toxicology*, 28, 73-101
- Cedergreen N, Streibig JC 2004. Independent action and apparent synergistic effects between toxicants. *SETAC Globe* 5, 33-34.
- Cedergreen N., Streibig JC 2005. Can the choice of endpoint lead to contradicting results of mixture toxicity experiments? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1676-1683.
- Cedergreen N, Streibig JC, Spliid NH 2004. Pesticiders påvirkning af planter og alger i vandmiljøet. Danish Environmental Protection Agency, Pesticide Research Report 89, 1-84.
- Cedergreen N, Streibig JC, Kudsk P, Møhlenberg F, Kamper A 2003. Er det synergi, når  $0+0=1$ ? *Vand og Jord* 10, 88-91.
- Chalvet-Monfray K, Belzunces L P, Colin M E, Fléche C, Sabatier P 1996. Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: modeling approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 525-534.
- Chen CY, CL Lu. 2002. An analysis of the combined effects of organic toxicants. *Science Total Environ* 289: 123-132.
- Colby SR 1967. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide concentrations. *Weeds* 15, 20-22.
- Dreschner K, Boedeker W 1995. Assessment of the combined effects of substances: The relationship between concentration addition and independent action. *Biometrics* 51, 716-730.
- Drost W, Backhaus T, Vassilakaki M, Grimme LH 2003. Mixture toxicity of s-triazines to *Lemna minor* under conditions of simultaneous and sequential exposure. *Fresenius Environmental Bulletin* 12, 601-607.
- DS/EN ISO 6341. Vandundersøgelser. Bestemmelse af mobilitetshæmning for *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) Toksicitetsprøvning.
- ECETOC 1993. Aquatic toxicity data evaluation. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Technical Report 56, 1-66.
- Faust M, Scholze M 2004. Competing concepts for the prediction of mixture toxicity: Do the differences matter for regulatory purposes? *EVKI-CT1999-00012*, 2-62. 2004.
- Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Blanck H, Boedeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Vighi M, Grimme LH 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology* 56, 13-32.

Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Blanck H, Boedeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Vighi M, Grimme LH 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology* 63, 43-63.

Faust M, Scholze M. 2004. Competing concepts for the prediction of mixture toxicity: Do the differences matter for regulatory purposes? EVKI-CT1999-00012, 2-62.

Feron VJ, Groten JP 2002. Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 825-839

Frankart C, Eullaffroy P, Vernet G 2002. Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 439-445.  
FødevareRapport 2003:12, Combined Actions and Interactions of Chemicals in Mixtures, ISSN 1399-0829. Tilgængelig på [www.fvst.dk](http://www.fvst.dk)

Gessner PK 1995. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. *Toxicology* 105, 161-179.

Greco WR, Unkelbach HD, Pösch G, Sühnel J, Kundi M, Bödeker W 1992. Consensus on concepts and terminology for combined action assessment: The Saariselkä agreement. *Archives of Complex Environmental Studies*, 4, 65-69.

Greco WR, Bravo G, Parsons JC 1995. The search for synergy: A critical review from a response surface perspective. *Pharmacological Reviews* 47, 332-385.

Grimme LH, Backhaus T 2003. Bridging effect assessment of mixtures to ecosystem situations and regulation. BEAM. Final Summary Report. 1-23.

Groten JP, Feron VJ, Sühnel J 2001. Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 316-322.

Haas CN, Stirling BA 1994. New quantitative approach for analysis of binary toxic mixtures. *Environmental toxicology and Chemistry* 13, 149-156.

Haas CN, Cidambi K, Kersten SP, Wright K 1996. Quantitative description of mixture toxicity: Effect of level of response on interactions. *Environmental toxicology and Chemistry* 15, 1429-1437.

Haas CN, Kersten SP, Wright K, Frank MJ, Cidambi K 1997. Generalization of independent response model for toxic mixtures. *Chemosphere* 34, 699-710.

Halekoh U 2004. Generalized Linear Models; Module 5: Logistic Regression. Noter til Master i statistik, KVL

Hatzios K, Penner D 1985. Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. *Reviews of Weed Science* 1, 1-63.

Hewlett PS 1969. Measurement of the potency of drug mixtures. *Biometrics* 478-487.

- International Organization for standardization 1989. Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. International Organization for standardization Geneva.
- Junghans M, Backhaus T, Faust M, Scholze M, Grimme LH 2003a. Toxicity of sulfonylurea herbicides to the green algae *Scenedesmus vacuolatus*. Predictability of combination effects. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 71, 585-593.
- Junghans M, Backhaus T, Faust M, Scholze M, Grimme LH 2003b. Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. Pest Management Science 59, 1101-1110.
- Kennaugh L, Pearce D, Daly JC, Hobbs AA 1993. A piperonyl butoxide synergizable resistance to permethrin in *Helicoverpa armigera* which is not due to increased detoxification by cytochrome P450. Pesticide Biochemistry and Physiology 45, 234-241.
- Kojima H, Katsura E, Takeuchi S, Niiyama K, Kobayashi K. 2004. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using chinese hamster ovary cells. Environ. Health Perspect. 112:524-531.
- Kortenkamp A, Altenburger R 1998. Synergisms with mixtures of xenoestrogens: a reevaluation using the method of isoboles. Sci. Total. Environ. 221:59-73.
- Kudsk P, Mathiassen SK 1995. Joint action of tribenuron and other broadleaf herbicides. In: Aspects of Applied Biology 41, Understanding Crop Protection Mixtures, Silsoe, UK, 95-102.
- Kudsk P, Mathiassen SK 2004. Joint action of amino acid biosynthesis-inhibiting herbicides. Weed Research 44, 313-322.
- Landolt E, Kandeler R 1987. Physiological characteristics. In The family of *Lemnaceae* - a monographic study, eds. E. Landolt and R. Kandeler, pp. 54-113. Zürich: Stiftung Rübel.
- Long M, Laier P, Vinggaard AM, Andersen HR, Lynggaard J, Bonfeld-Jørgensen EC. 2003. Effect of currently used pesticides in the AhR-CALUX assay: comparison between the human TV101L and the rat H4IIE cell line. Toxicology 194, 77-93.
- Maeng J, Khudairi AK 1973. Studies on the flowering mechanism of *Lemna* I. Amino acid changes during flower induction. Physiologia Plantarum 28:264-270.
- Mathiassen SK, Kudsk P 1993. Joint action of sulfonylurea herbicides and MCPA. Weed Research 33, 441-447.
- Mayer P, Cuhel R, Nyholm N 1997. A simple *in vitro* fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31:2525-2561.

- Merino-Garcia D, Kusk KO, Christensen ER. 2003. Joint toxicity of similarly and dissimilarly acting chemicals to *Daphnia magna* at different response levels. *Arch Environ Contam Toxicol.* 45, 289-296
- Nellemann C., Dalgaard M., Lam HR, Vinggaard AM. 2003. The combined effects of vinclozolin and procymidone do not deviate from expected additivity in vitro and in vivo. *Toxicol. Science* 71, 251-262.
- OECD. ACUTE TOXICITY TO AQUATIC INVERTEBRATES: *Daphnia* sp.: Acute Immobilisation Test; Ref. OECD TG 202
- Ousterhout J, Struck RF, Nelson JA 1981. Estrogenic activities of methoxychlor metabolites. *Biochem. Pharmac.* 30, 2869-2871.
- Payne J, Rajapakse N, Wilkins M, Kortenkamp A 2000. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 108, 983-987.
- Payne J, Scholze M, Kortenkamp A. 2001. Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. *Environ. Health Perspect.* 109, 391-397.
- Pilling ED, Bromley-Challanor KAC, Walker CH, Jepson PC 1995. Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 51, 1-11.
- R Development Core Team 2004. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A 2002. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ. Health Perspect.* 110, 917-921.
- Rajapakse N, Silva E, Scholze M, Kortenkamp A 2004. Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol detected in the E-SCREEN assay. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6343-6352.
- Reffstrup TK 2002. Combined actions of pesticides in food. Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, Fødevaredirektoratet. FødevareRapport 2002:19. ISBN: 87-91189-54-3.
- Ritz C, Streibig JC 2005. Bioassay analysis using R. *Biometrics* (submitted).
- Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A 2002. Something from "nothing"--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol* 36, 1751-1756.
- Streibig JC 1983. Joint action of root-absorbed mixtures of DPX-4189 and linuron in *Sinapis alba* L. and barley. *Weed Research* 23, 3-9.

Streibig JC 1987. Joint action of root absorbed mixtures of auxin herbicides in *Sinapis alba* L. and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Weed Research* 27, 337-347.

Streibig JC, Jensen JE 2000. Action of herbicides in mixtures. In: *Herbicides and their Mechanisms of Action*, edited by A. H. Cobb and R. C. Kirkwood, Sheffield:Sheffield Academic Press Ltd., p. 153-180.

Streibig JC, Kudsk P, Jensen JE 1998. A general joint action model for herbicide mixtures. *Pesticide Science* 53, 21-27.

Streibig JC, Dayan FE, Rimando AM, Duke SO 1999. Joint action of natural and synthetic photosystem II inhibitors. *Pesticide Science* 55, 137-146.

Sørensen H, Cedergreen N, Skovgaard I, Streibig JC 2005a. An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. Submitted to *Environmental and Ecological Statistics*.

Sørensen H, Cedergreen N, Skovgaard I, Streibig JC 2005b. Testing for concentration addition in binary mixture toxicity experiments: a twostep procedure allowing for extra variation. Submitted to *Biometrics*.

Thompson HM 1996 Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. *Ecotoxicology* 5, 59-81.

Vanwijk RJ, Postma JF, Vanhouwelingen H (1994) Joint toxicity of ethyleneamines to algae, daphnids and fish. *Environmental toxicology and Chemistry* 13, 167-171.

Vinggaard AM, Bonfeld-Jørgensen E, Andersen HR, Hass U, Nellemann C, Birkhøj M, Jarfelt K, Dalgaard M, Lam HR, Jacobsen H 2004. Hormonforstyrrende effekter af kombinationer af pesticider. Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen, rapport nr. 88.

Vinggaard AM, Hnida C, Breinholt V, Larsen JC 2000. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicology in vitro* 14, 227-234.

Vølund A 1992. Dose response surface bioassay. In XVIth International Biometric Conference. p 249. Hamilton, New Zealand.

White DB, Faessel HM, Slocum HK, Khinkis L, Greco WR 2004. Nonlinear response surface and mixture experiment methodologies applied to the study of synergism. *Biometrical Journal* 46, 6-71.

Wilkinson CF, Hetnarski K, Hicks LJ 1973. Substituted imidazoles as inhibitors of microsomal oxidation and insecticide synergists. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 4, 299-312.