Beiträge zur Toxikologie der Fische

IV.

**Statistische Überlegungen
zu toxikologischen Experimenten und
Fischvergiftungen in freien Gewässern**

Von K. WUHRMANN und H. WOKER¹⁾

Eingegangen am 6. Februar 1950

Die in der Fischtoxikologie oft übliche Festlegung von Toxizitätsgrenzen für Fischgifte verhindert gelegentlich die unbefangene Beurteilung der *Genauigkeit* solcher Angaben. Experimentelle Untersuchungen zeigen, daß auch bei Fischversuchen die allen Tierexperimenten innewohnenden großen Streuungen auftreten. Es ist auch unzweifelhaft, daß bei Fischvergiftungen im freien Gewässer sowohl die Empfindlichkeitsunterschiede verschiedener Arten und Altersklassen von Fischen als auch *individuelle Differenzen* innerhalb scheinbar gleichartiger Kollektive eine große Rolle für das Ausmaß eines Schadens und dessen spätere Beurteilung spielen müssen.

Da uns heute ein ziemlich umfangreiches Material experimenteller Beobachtungen an Fischen zur Verfügung steht, erachten wir es als nützlich, speziell folgenden Fragen Aufmerksamkeit zu schenken.

1. Wie groß sind die Streuungen in der Reaktionszeit einer größeren Anzahl gleichartiger Fische, wenn sie unter identischen Bedingungen vergiftet werden?
2. Wie viele Tiere sind bei toxikologischen Versuchen überhaupt zu prüfen, um für eine bestimmte Giftwirkung einen zuverlässigen Mittelwert der Reaktionszeit zu erhalten?
3. Wie sind die in der Literatur veröffentlichten Ziffern über Toxizitätsgrenzen usw. zu bewerten, die öfters nur aus Versuchen mit einem einzigen oder sehr wenigen Fischen entstanden?

Es soll versucht werden, auf Grund unserer bisherigen Versuche, die durch speziell angelegte Experimente mit größeren Zahlen von Versuchs-

¹⁾ Mitteilung aus der Eidg. Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz an der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

tieren ergänzt wurden, eine Beantwortung dieser Fragen zu erreichen. Die Berechnungen stützen sich zur Hauptsache auf die Methoden, wie sie von RIEBESELL [1]¹⁾, LINDER [2]²⁾ und BROWNLEE [3] angegeben wurden. Für die mathematischen Grundlagen wird auf diese Arbeiten verwiesen. Alle zur Beurteilung verwendeten Versuche wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt.

1. Verteilung der Manifestationszeiten einer größeren Anzahl gleichzeitig und gleichartig vergifteter Fische

Die Beantwortung der aufgeworfenen Fragen mit Hilfe der einfacheren statistischen Rechnungsmethoden ist nur möglich, wenn nachgewiesen wird, daß die Reaktionszeiten einer größeren Zahl von Fischen, die unter

Abb. 1a, b: Verteilungskurven für die beobachteten Manifestationszeiten (Versuchsbedingungen vgl. Abbildung) an *Elritzen*. Berechnete Normalverteilung: schwach ausgezogen; Abszissen: Klassen der Manifestationszeiten; Ordinaten: Individuenzahl pro Klasse.

¹⁾ Die Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis auf S. 93.

²⁾ Wir möchten Herrn Prof. Dr. A. LINDER für die Durchsicht unseres Manuskriptes den besten Dank aussprechen.

identischen Bedingungen geprüft werden, *normal verteilt* sind. Bei speziellen Versuchen mit je ca. 100 *Elritzen* bei vier verschiedenen Ammoniakkonzentrationen wurde diese Forderung erfüllt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. I zusammengestellt; sie können zugleich als Grundlage für die weiteren statistischen Untersuchungen dienen. In Abb. 1a und 1b wurden Beispiele für Verteilungen unter Berücksichtigung von angemessenen Klassenbreiten graphisch aufgetragen (vgl. auch Tab. I). Die Kurven für die theoretischen Verteilungen, welche sich aus den Streuungen und den verwendeten Klassenbreiten ergeben, sind nach den Angaben von RIEBELLE berechnet. Man sieht sofort, daß alle Versuche nur ungefähr einer Normalverteilung entsprechen, sich einer solchen bei Verwendung von mehreren hundert Tieren wahrscheinlich aber weitgehend annäherten. Die Mittelwerte der Hunderterversuche sowie auch die Streuungen würden sich dabei vermutlich nicht mehr wesentlich verändern. Wir sind deshalb berechtigt, diese Versuchsreihen als «große Stichproben» zu betrachten, deren Mittelwerte und Streuungen in vernachlässigbarer Weise von den entsprechenden Werten bei einer unendlich großen Zahl von Versuchsfischen (Grundgesamtheit nach LINDER) abweichen. Die auf diese Annahme gestützten Rechnungen dürften für die experimentelle Praxis genügend zuverlässige Resultate geben.

2. Beurteilung von Durchschnitten aus Versuchen mit je 10 Fischen

Es ist aus verschiedenen Gründen unerwünscht, mindestens 100 Fische pro Versuch verwenden zu müssen. Wir untersuchen deshalb zunächst die Bedeutung von Durchschnitten aus *Zehnerversuchen*, die sich z.B. bei kleinen Fischarten (*Elritzen*, *Sonnenbarschen* usw.) sehr gut durchführen lassen.

Führen wir bei identischen Bedingungen mehrmals denselben Versuch mit je einer zureichenden Zahl von Fischen aus, so sind die Mittelwerte dieser Parallelversuche auch normal verteilt, und es ist deshalb möglich, die wahrscheinliche Häufigkeit der verschiedenen Durchschnitte, die auftreten können, zu berechnen.

Kennen wir für bestimmte Versuchsbedingungen den Durchschnitt μ der Grundgesamtheit mit der Streuung σ , und führen wir nun N Parallelversuche aus, deren einzelne Durchschnitte $\bar{x}$ und Streuungen $\sigma_{\bar{x}}$ sein sollen, so ist die Streuung aller dieser Durchschnitte der Parallelversuche:

$$\sigma_{\bar{x}}^2 = \frac{\sigma^2}{N}.$$

Tabelle 1
Reihenversuche mit Ammoniak an Elritzen

I				II				III				IV				V			
(NH ₄) ₂ SO ₄ 3120 mg/l NH ₃ 22,0 mg/l p _H 8,0 t 14 ⁰ N = 88 σ ² = 5,40 σ = 2,32				(NH ₄) ₂ SO ₄ 3000 mg/l NH ₃ 21,0 mg/l p _H 8,0 t 14 ⁰ N = 60 σ ² = 9,88 σ = 3,14				(NH ₄) ₂ SO ₄ 900 mg/l NH ₃ 5,84 mg/l p _H 8,0 t 15 ⁰ N = 99 σ ² = 37 σ = 6,08				(NH ₄) ₂ SO ₄ 700 mg/l NH ₃ 5,05 mg/l p _H 8,0 t 14 ⁰ N = 97 σ ² = 72 σ = 8,49				(NH ₄) ₂ SO ₄ 750 mg/l NH ₃ 3,37 mg/l p _H 8,0 t 14 ⁰ N = 93 σ ² = 69,48 σ = 8,35			
t _M	f _i	F _i k=2'	F (ber.)	t _M	f _i	F _i k=2'	F (ber.)	t _M	f _i	F _i k=4'	F (ber.)	t _M	f _i	F _i k=6'	F (ber.)	t _M	f _i	F _i k=6'	F (ber.)
7	1	1	0	10	3			16	0			13				30			
8	2	3	1,2	11	11	14	6,8	17	3			14				31			
9	1			12	6	13	12,4	18	1	6	3,7	15				32			
10	7	12	6,8	13	7			19	2			16		1	2,8	33		3	2,6
11	5			14	8	16	15,2	20	2			17	1			34	1		
12	11	21	20,8	15	8			21	2			18	0			35	2		
13	10	25	30,2	16	4	8	12,4	22	5	17	11	19	2			36	0		
14	15			17	4			23	8			20	1			37	0		
15	10	25	30,2	18	3			24	6			21	0			38	3		
16	7	15	20,8	19	0	3	6,8	25	3			22	2	9	10,0	39	1	12	9,4
17	8			20	4			26	6	19	20,9	23	4			40	0		
18	6	8	6,8	21	1	5	2,5	27	4			24	0			41	8		
19	2	3	1,2	22	1			28	3			25	3			42	5		
20	2			23	0	1	0,6	29	7			26	9			43	3		
21	1	0	0	24	0			30	4	16	26	27	4	34	21,1	44	2	19	20,6
22	0			25	0	0	0	31	2			28	6			45	5		
23	0							32	6			29	8			46	2		
								33	5	20	20,9	30	4			47	2		
								34	4			31	1			48	4		
								35	5			32	5			49	2		

K. Wuhmann und H. Wöker

Hydrol.

Die Abweichungen der Durchschnitte $\bar{x}$ der Parallelversuche vom Durchschnitt μ der Grundgesamtheit sind ebenfalls normal verteilt. Aus den Abszissen x der einzelnen Abweichungen $\bar{x} - \mu$ in der standardisierten Verteilungskurve können wir dann die Häufigkeit (z. B. in $P\%$) von Abweichungen ermitteln, welche größer sind als die Werte $\bar{x} - \mu$. Wir erhalten damit eine Maßzahl für die Zuverlässigkeit unseres Mittelwertes aus einem Zehnerversuch.

Die Abszissen x ergeben sich nach LINDER zu:

$$x = \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma} \sqrt{N} \quad \text{oder} \quad x = \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma_{\bar{x}}} \quad (I)$$

Wir nehmen für die vorstehenden Versuche V und II (Tab. I) mit je ca. 100 Elritzen die erhaltenen Mittelwerte und Streuungen als solche einer Grundgesamtheit an. Wir fanden:

Reihe V	Reihe II
p_H : 8,0; $(NH_4)_2SO_4$: 750 mg/l	p_H : 8,0; $(NH_4)_2SO_4$: 3000 mg/l
NH_3 = 3,37 mg/l	NH_3 = 21,0 mg/l
μ = 51 min	μ = 14,2 min
σ = 8,82 min	σ = 3,14 min

Bei denselben zwei Versuchsbedingungen ausgeführte Zehnerversuche ergaben z. B. folgendes Resultat:

Reihe V'	Reihe II'
$N = 9$ Versuche zu 10 Fischen	$N = 6$ Versuche zu 10 Fischen,
$\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = 2,94.$	$\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{N'}} = 1,18.$

Tabelle 2a

Ergebnisse von Versuchen mit je 10 Elritzen, 3,37 mg NH_3 /l, Reihe V'

Parallel- versuch Nr.	$\bar{x}$ Minuten	$\bar{x} - \mu$		x	$P\%$
		Minuten	Prozent von $\bar{x}$		
1	58	+7	+13	+2,38	1,5
2	53	+2	+4	+0,68	50
3	53	+2	+4	+0,68	50
4	50	-1	-2	-0,34	73
5	48	-3	-6	-1,02	31
6	53	+2	+4	+0,68	50
7	49	-2	-4	-0,68	50
8	52	+1	+2	+0,34	73
9	46	-5	-10	-1,70	8

Tabelle 2b

Ergebnisse von Versuchen mit je 10 Elritzen, 21,0 mg NH₃/l, Reihe II'

Parallel- versuch Nr.	$\bar{x}$ Minuten	$\bar{x} - \mu$		x	P %
		Minuten	Prozent von $\bar{x}$		
1	14,3	+0,1	+0,7	+0,08	93,5
2	14,2	0	0	0	100
3	14,5	+0,3	+2,2	+0,25	80
4	14,6	+0,4	+2,8	+0,34	73,5
5	14,4	+0,2	+1,4	+0,17	85,5
6	13,9	-0,3	-2,1	-0,25	80
⋮					
n (berechnet)	{ 17,2 10,9	±3,03	21,4	2,575	1

Wir finden z. B. in Reihe V' bei Manifestationszeiten von rund 50 min, daß in Durchschnitten von Zehnerversuchen eine Abweichung vom wahrscheinlichsten Mittelwert von mehr als 13% (7 min) nur in 1–2 Fällen von 100 Versuchen auftritt, derartig «große Ungenauigkeiten» also selten sind. Abweichungen von mehr als $\pm 10\%$ oder rund 5 min sind aber bereits in 8 Fällen von 100 zu erwarten.

In Reihe II' mit nur 14,2 min Manifestationszeit ergibt sich, daß die Mittelwerte der ausgeführten Zehnerversuche allerdings wenig voneinander abweichen, diese Reihe aber keineswegs als genauer zu beurteilen ist als Reihe V'. In Reihe V' ist z. B. zu erwarten, daß rund 73% der Versuche eine größere Abweichung als 2% vom wahrscheinlichsten Mittelwert aufweisen werden. In Reihe II' wird dieser Prozentsatz für die gleiche Abweichung rund 80% betragen. Es ist als Zufall zu bezeichnen, daß die Mittelwerte der sechs Versuche der Reihe II' so gut untereinander und mit dem Mittelwert der Grundgesamtheit übereinstimmen. Bei einer Streuung $\sigma_{\bar{x}} = 1,18$ von Zehner-Parallelversuchen ist nämlich zu erwarten, daß die Grenzen, zwischen denen die Mittelwerte von 99 Versuchen von 100 liegen können, 10,9 bzw. 17,2 min betragen (theoretischer Versuch Nr. II' der Tab. 2b für Reihe II').

3. Individuenzahl für Vergiftungsversuche mit Elritzen

Auf Grund der Annahme, daß die Mittelwerte und Streuungen der Versuche mit 100 Fischen solchen der Grundgesamtheit bei diesen Giftkonzentrationen entsprechen, können wir auch folgende, methodisch grundlegende Frage beantworten:

Wie viele Tiere sind pro Vergiftungsversuch zu verwenden, damit der Mittelwert der Manifestationszeiten eine zum voraus gewünschte Abweichung vom wahrscheinlichsten Mittelwert bei der entsprechenden Giftkonzentration nicht überschreitet, oder daß er beispielsweise auf mindestens $\pm 10\%$ genau ist?

Der Berechnungsgang ist umgekehrt wie vorhin bei der Bestimmung der Genauigkeit der Zehnerversuche. Gegeben sind:

1. die Sicherheitsgrenzen P der Normalverteilung, zwischen denen die Mittelwerte der Versuche schwanken dürfen;
2. Mittelwert μ und Streuung σ der Grundgesamtheit;
3. gewünschte maximale Abweichung $\bar{x} - \mu$ des Mittelwertes unseres Versuches vom wahrscheinlichsten Mittelwert (Grundgesamtheit).

Gesucht ist die Zahl N der Fische, damit die vorausgesetzten Bedingungen eines Versuches gewährleistet sind. Aus der bereits erwähnten Beziehung (I) erhalten wir:

$$\sqrt{N} = \frac{x \sigma}{\bar{x} - \mu}$$

x ist wiederum die Abszisse der Sicherheitsgrenze in der Verteilungskurve und kann für jedes P einer entsprechenden Tabelle entnommen werden.

Beispiel: Wir haben gefunden, daß mit 100 Elritzen bei 22 mg NH_3/l bei 14°C ein Mittelwert der Manifestationszeit von $\mu = 14,2$ min und eine Streuung von $\sigma = \pm 2,32$ min erhalten wird (Reihe I). Wie viele Fische werden benötigt, damit in 99 von 100 Versuchen ein Mittelwert herauskommt, der höchstens $\pm 10\%$ vom Werte von 14,2 min abweicht?

$$\begin{aligned} \mu &= 14 \text{ min} & \sigma &= \pm 2,32, \\ P &= 1\%, \text{ hieraus} & x &= 2,575 \text{ (Tabellenwert)}, \\ \bar{x} - \mu &= \pm 10\% \text{ von } 14,2 & &= \pm 1,4 \text{ min}, \\ \sqrt{N} &= \frac{2,575 \cdot 2,32}{1,4} & &= 4,26, \\ N &= 18 \text{ Versuchstiere.} \end{aligned}$$

In einem Versuch mit beispielsweise 10 oder 5 Tieren werden wir unter den gewählten Bedingungen niemals die Genauigkeit von $\pm 10\%$ vom wahrscheinlichsten Mittelwert erhalten, sondern wir haben folgende Abweichungen zu erwarten:

$$\begin{aligned} \text{bei 10 Tieren } \pm 13,4\% &= \pm 1,9 \text{ min,} \\ \text{bei 5 Tieren } \pm 19\% &= \pm 2,7 \text{ min,} \\ \text{bei 1 Tier } \pm 42,3\% &= \pm 6,0 \text{ min.} \end{aligned}$$

Dabei haben wir damit zu rechnen, daß hie und da (theoretisch 1 vom Hundert) sogar ein Versuch mit 18 Tieren zufällig eine wesentlich größere Abweichung als $\pm 10\%$ vom Mittelwert erreichen kann.

In Tab. 3 wurden für Bereiche von Manifestationszeiten um rund 14 min und um rund 50 min auf Grund der Hunderterversuche ausführlichere Angaben über die Zahl benötigter Versuchstiere zur Erfüllung bestimmter Genauigkeitsanforderungen der Mittelwerte zusammengestellt.

Zahl der Versuchstiere für eine vorbestimmte Genauigkeit von Mittelwerten bei ca. 20 mg NH₃/l und ca. 5 mg NH₃/l (Grundlage: Experimente I und V)

Tabelle 3

$t_M = 51$ Minuten				$t_M = 14$ Minuten			
Erlaubte Abweichung vom wahrscheinlichen Mittelwert	Sicherheitsgrenzen			Erlaubte Abweichung vom wahrscheinlichen Mittelwert	Sicherheitsgrenzen		
	99%	95%	90%		99%	95%	90%
	Zahl der Versuchstier:				Zahl der Versuchstiere		
$\pm 1\%$	1850	1070	760	$\pm 1\%$	1820	1060	750
$\pm 5\%$	74	43	30	$\pm 5\%$	73	42	30
$\pm 10\%$	18	11	7	$\pm 10\%$	18	11	8
$\pm 20\%$	4-5	3	2	$\pm 20\%$	4-5	3	2

Die Zusammenstellung zeigt, daß man mit ganz beachtlichen Mengen von Versuchstieren rechnen muß, wenn man Vergiftungsversuche mit einiger Präzision ausführen will. Es ist dabei auch noch daran zu denken, daß es sich in den zitierten Beispielen um Beobachtungen an *Ammoniakversuchen* handelt, die wegen der besonderen Reaktion der Fische eine *ausnahmsweise genaue Messung* der individuellen Manifestationszeiten gestatten. Subjektive Meßfehler sind hier an den Streuungen der Einzelwerte kaum beteiligt. Ist die Reaktion der Fische weniger eindeutig, wie bei Phenol-, Zyanid- usw. Vergiftungen, so sind subjektive Beeinflussungen der Messungsergebnisse unvermeidlich. Im Mittel werden die Streuungen deshalb wahrscheinlich größer, und damit wächst auch die Zahl der Versuchstiere, welche für zuverlässige Mittelwerte beobachtet werden müssen.

4. Beurteilung von Versuchen mit wenigen Versuchstieren

Ein erheblicher Teil unserer früheren toxikologischen Untersuchungen wurde mit nur 4-5 Versuchstieren ausgeführt (WUHRMANN und WOKER [4], WOKER [6]). Dies betrifft insbesondere auch die zahlreichen Experi-

mente zur Feststellung der Empfindlichkeitsunterschiede verschiedener Fischarten gegenüber Ammoniak (eine Darstellung dieser Ergebnisse erfolgt später). Es erhebt sich damit die Frage, wie weit die zwischen Fischen verschiedener Arten festgestellten Differenzen in der Reaktionszeit – bei gleichen Giftkonzentrationen – wirklich reell sind. Ferner muß auch untersucht werden, ob die verschiedenen Meßwerte, welche zur Erstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve dienen, reelle Unterschiede wiedergeben. Man kann die Frage auch wie folgt umkehren:

Wie groß müssen in den einzelnen Konzentrationsbereichen die Unterschiede in den Reaktionszeiten bei zwei verschiedenen Giftkonzentrationen mindestens ausfallen, damit bei Verwendung von z. B. fünf Fischen ein reeller Unterschied zwischen den Mittelwerten besteht?

Führen wir bei gleichen Giftkonzentrationen eine große Reihe von Versuchen mit je fünf Fischen durch, so sind die Mittelwerte aus diesen Experimenten wegen der kleinen Individuenzahl pro Versuch nicht mehr normal verteilt, sondern gruppieren sich zu einer flacher verlaufenden Verteilungskurve, der sogenannten t -Verteilung.

An Hand der in Tab. 4 wiedergegebenen vollständigen Ergebnisse einer Vergiftungsreihe von Elritzen mit Ammoniak stellt man fest, daß die Streuungen im Bereiche von Manifestationszeiten zwischen rund 25 und 50 min im Mittel ca. 9 min betragen. Desgleichen ergibt sich für t_M -Werte unter 20 min eine Streuung um 1,5 min. Welche Unterschiede in den Manifestationszeiten sind in diesen Bereichen wirklich reell?

Die Streuung s_d der Differenzen zwischen zwei Durchschnitten $\bar{x}'$ und $\bar{x}''$ aus N_1 und N_2 Einzelmessungen x'_i und x''_i ergibt sich bei t -Verteilung zu:

$$s_d^2 = \frac{1}{N_1 + N_2 - 2} \left[\sum_1^{N_1} (x'_i - \bar{x}')^2 + \sum_1^{N_2} (x''_i - \bar{x}'')^2 \right].$$

Da in den erwähnten Versuchen die Individuenzahl und die Streuungen gleich sind, ist die Streuung s_d der Differenzen zwischen den Versuchsdurchschnitten gleich der Streuung der Einzelversuche, $s_d = s' = s''$.

Wenn zwei Mittelwerte wirklich voneinander verschieden sind, dann muß ihre Differenz in einer großen Zahl von Versuchen, z. B. in 95 von Hundert, regelmäßig auftreten. Bei der t -Verteilung ergibt sich die Abszisse der Verteilungskurve für die prozentuale Häufigkeit des Auftretens

einer Differenz zwischen den Mittelwerten $\bar{x}'$ und $\bar{x}''$ aus N_1 und N_2 Einzelbestimmungen zu:

$$t = \frac{\bar{x}' - \bar{x}''}{s_d} \sqrt{\frac{N_1 N_2}{N_1 + N_2}}$$

Tabelle 4

Vergiftungsreihe mit je 5 Elritzen, p_H 6,5–8,5, $t = 14^\circ C$

Versuch Nr.	Ammoniak mg NH_3 /l	t_M Minuten $\bar{x}$	Streuung $\pm s$	
			Minuten	Prozent von $\bar{x}$
Vv 16	0,60	2755	± 1150	$\pm 41,8$
Vv 16'	1,31	129	22	17
Vv 15	2,28	74	21	28,4
Vv 15'	3,54	49	8	16,3
Vv 15''	4,67	38	10	26,4
St. IV	5,05	34	9	21,4
Vv 12	5,11	32	10	31,2
Vv 12'	6,66	25	8	32
Vv 11	9,48	24	6	25
Vv 11'	14,9	17	2	11,8
Vv 13	15,33	21	5	23,8
Vv 13'	20,97	10	1	10
St. I	22,04	14	3	21,4
Vv 9	34,0	14	2	14,3
Vv 14	43,9	10	1	10
Vv 14'	69,5	7	1	14,3
Vv 10	100,0	4	1	25

Für den Bereich der Reaktionszeiten von

25–50 min ist im Mittel $s = s_d = 9$ min,

für den Bereich von

4–10 min ist im Mittel $s = s_d = 1,5$ min.

Für

$$N_1 = N_2 = 5$$

und

$$P = 0,05.$$

(Häufigkeit einer eindeutigen Differenz zwischen zwei Versuchen = 95%)

wird

$$t = 2,306,$$

somit

$$\bar{x}' - \bar{x}'' = \frac{t - s_d}{\sqrt{\frac{N^2}{2N}}}$$

oder

$$\bar{x}' - \bar{x}'' = \frac{2,306 \cdot 9}{1,58} = 13 \text{ min},$$

bzw.

$$\bar{x}' - \bar{x}'' = \frac{2,306 \cdot 1,5}{1,58} = 2,2 \text{ min}$$

Wir finden also, daß bei Manifestationszeiten im Bereiche zwischen 25 und 50 min eine Differenz von mindestens 13 min zwischen zwei Versuchen mit fünf Fischen vorhanden sein muß, damit wir sagen können, sie seien wirklich und mit großer Wahrscheinlichkeit reproduzierbar voneinander verschieden. Bei kurzen Manifestationszeiten (hohe Ammoniakkonzentrationen) müssen mindestens 2 min für eine mehr als zufällige Differenz zwischen den Versuchen vorhanden sein. Wir können diese Tatsache leicht an folgendem Versuchspaar direkt bestätigen:

Versuch Nr. Vv 15' $c = 3,54 \text{ mg NH}_3/\text{l}$, $t_M = 49 \pm 8 \text{ min}$

Vv 15'' $c = 4,67 \text{ mg NH}_3/\text{l}$, $t_M = 38 \pm 10 \text{ min}$

$$s_d = 9,14,$$

$$t = \frac{\bar{x}' - \bar{x}''}{s_d} \sqrt{\frac{N^2}{2N}}$$

$$t = 1,92.$$

Für $t = 1,92$ wird $P \gg 0,05$, d. h. die Differenz von 11 min zwischen den zwei Versuchen wird in viel weniger als 95 von hundert Fällen eintreten; sie ist also nicht als gesichert zu betrachten. Es ergibt sich damit, daß speziell in Bereichen mit erheblichen Streuungen der Vergiftungszeiten die Interpretation der Ergebnisse mit größter Vorsicht zu geschehen hat. Bei Verwendung von je einem Versuch mit lediglich je fünf Fischen kann z. B. gar nicht sicher zwischen der Wirkungszeit von Ammoniakkonzentrationen unterschieden werden, die um rund 1 mg/l (z. B. 3 mg/l und 4 mg/l) voneinander abweichen.

Wir möchten in diesem Zusammenhang noch zwei Versuchsserien an Bachforellen prüfen. Es ist dabei folgende Frage zu beantworten:

Sind *Bachforellensommerlinge* und *Bachforellenjährlinge* verschieden empfindlich gegenüber Ammoniak?

Die beiden Versuchsserien wurden unabhängig voneinander, aber immer mit je fünf Tieren pro Experiment ausgeführt, so daß die Bestimmungen der Manifestationszeiten nicht bei genau den gleichen Ammoniakkonzentrationen erfolgten. Wir können deshalb nur wenige Versuchspaare prüfen, die unter annähernd denselben Bedingungen erhalten wurden:

Tabelle 5

Empfindlichkeit von Bachforellensömmerlingen und -jährlingen gegenüber Ammoniak

Sömmerlinge			Jährlinge			s_d	t	Beurteilung der Verschiedenheit
NH_3 mg/l	t_M Minuten	s	NH_3 mg/l	t_M	s			
3,35	56	± 13	3,39	78	± 22	18,8	1,93	nicht gesichert
11,4	31	± 3	10,98	62	± 15	10,5	4,67	gesichert
22,0	25	± 4	20,88	45	± 7	5,9	5,36	gesichert
39,3	11	± 2	39,3	29	± 8	6,3	3,26	gesichert
108	8	± 1	106,2	14	± 2	1,7	5,58	gesichert

Wir finden, daß mit Ausnahme der Versuche bei niedrigen Ammoniakkonzentrationen die Unterschiede in der Reaktion zwischen den beiden Altersklassen als reell zu betrachten sind bzw. die *Sömmerlinge eindeutig empfindlicher* waren als die Jährlinge. Bei den niederen Konzentrationen müßten die Mittelwerte der Manifestationszeiten unter Verwendung von mehr als fünf Tieren pro Versuch ermittelt werden, um eine Differenz zwischen den Altersklassen sicherzustellen.

5. Schlußfolgerungen

Die Beobachtungen hinsichtlich der Streuung bei Fischvergiftungsversuchen sind durchaus selbstverständlich, wenn man die Genauigkeit von Tierversuchen im allgemeinen berücksichtigt. Es muß als Nachteil empfunden werden, daß bei fischtoxikologischen Arbeiten diesem Gesichtspunkt bisher oft wenig Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Ganz besondere Vorsicht ist bei vergleichenden Experimenten aller Art am Platze. *Die Anzahl der pro Meßpunkt benötigten Fische ist unter allen Umständen auf mindestens fünf zu veranschlagen.* Bei sehr kurzen Reaktionszeiten (unter 10 min) genügen evtl. weniger Tiere, sofern es nicht darauf ankommt, innerhalb des Bereiches – z. B. von 0–10 min – eine genauere Abstufung festzustellen.

Die sehr großen Variationsbreiten, welche bei der gleichzeitigen Prüfung vieler Fische zutage traten, lassen *alle Angaben in der Literatur, Gutachten usw. über Vergiftungszeiten, die nur an einzelnen Tieren gemessen wurden, als sehr fragwürdig erscheinen.* Es sei lediglich nochmals daran erinnert, daß sogar bei den relativ günstigen Verhältnissen von NH_3 -Vergiftungen die Reaktionszeiten gemäß Verteilungskurve bei z. B. 3,3 mg NH_3 /l zwischen 34 und 75 min liegen können. Bei dieser Konzentration ist bei *Einzelmessungen* damit zu rechnen, daß sie beispielsweise in 30% der Fälle einen Fehler von immer noch $\pm 9,5$ min = ca. $\pm 20\%$ aufweisen können. Es ist deshalb als reiner Zu-

fall zu betrachten, wenn mit solchen Experimenten Vergiftungszeiten beobachtet werden, die genauer sind als bestenfalls $\pm 20\%$ des wahrscheinlichsten Mittelwertes. Sobald *genauere Messungen* vorzunehmen sind oder z. B. *sekundäre Einflüsse* auf die Reaktionsweise der Tiere (Temperatur, Sauerstoffgehalt usw.) festgestellt werden sollen, sind *zehn Tiere pro Versuch* ein unbedingtes Minimalerfordernis.

Wir weisen in diesem Zusammenhang z. B. auf unsere 3. Mitteilung hin (WOKER [6]), in welcher die Temperaturabhängigkeit der Ammoniakwirkung auf *Alet* geprüft wurde. Jene Versuche erfolgten an je fünf Fischen, und es wurde beobachtet, daß zwischen 12° und 25° C kein Unterschied in der Reaktionszeit eintrat. Die rechnerische Nachprüfung dieser Experimente zeigte, daß bei Verwendung von größeren Zahlen von Versuchstieren sehr wahrscheinlich eine, allerdings nur geringe Zunahme der Giftwirkung von Ammoniak mit steigender Temperatur hätte festgestellt werden können.

Die Beobachtungen über die Variationsbreite der Vergiftungsreaktionen haben auch *praktische Bedeutung*. In sehr vielen Fällen wird nach einer Fischvergiftung in einem Gewässer eine nur beschränkte Zahl toter Tiere festgestellt. Es wird dann oft die Auffassung geäußert, der restliche Bestand sei ebenfalls vernichtet, jedoch wegen Raubes, Abschwemmung usw. nicht mehr auffindbar. Die Experimente zeigen, daß in einem vergifteten Gewässer (auch wenn *sämtliche* Fische mit dem Gifte *gleich lang* in Berührung sind) sehr wohl ein mehr oder weniger großer Prozentsatz das Ereignis heil überstehen können. Es ist deshalb unseres Erachtens nicht angängig, den Vergiftungserfolg in einem geschädigten Gewässer an Hand subjektiver Feststellungen abschätzen zu wollen. Als bestes Mittel, um über eine effektive Schädigung eines Bestandes Aufschluß zu erhalten, erscheint uns in solchen Fällen z. B. eine Bestandesaufnahme mittels eines Elektrofängerges, die möglichst bald nach dem Vergiftungsfall vorzunehmen ist.

SUMMARY

- (1) A large number of experiments in fish intoxications with different poisons has been statistically proved, and the accuracy of the means of the reaction times in experiments with different numbers of fish per assay was calculated.
- (2) Special investigations with approximately 100 fish in each experiment (ammonia in different concentrations as poison) served for the calculation of deviations and the estimation of the number of fish required in each experiment, supposed to satisfy a previously fixed degree of accuracy.

- (3) The considerable variabilities of the reaction times in all concentrations of ammonia and other poisons demonstrate that for securing average values with less than 20% deviation of the most probable mean for the concentration proved, at least five fish per assay are required. For more reliable experiments (i. e. comparative tests) at least ten individuals are to be proved.
- (4) With poisons of less striking effects than ammonia (i. e. phenol, cyanids, etc.) the variabilities are larger and even more individuals are required for each experiment.
- (5) The variations in reaction times of the same fish species are to be considered in practical field work on fish intoxications.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] RIEBESELL, P., *Biometrik und Variationsstatistik*, in: ABDERHALDEN, *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. V, Teil 2 (URBÄN & SCHWARZENBERG, Berlin).
- [2] LINDER, A., *Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Biologen* (Birkhäuser, Basel 1945).
- [3] BROWNLEE, K. A., *Industrial Experimentation* (His Majesties Stationery Office, London 1949).
- [4] WUHRMANN, K., und WOKER, H., Schweiz. Z. Hydrol. 11, 210 (1948).
- [5] WUHRMANN, K., WOKER, H., und ZEHENDER, F., Vjschr. naturf. Ges. Zürich 92, 198 (1948).
- [6] WOKER, H., Verh. X. int. Kongr. Ver. theor. u. angew. Limnol. 10, 575 (1949).