



Bioakkumulations- und Metabolismusstudien an Fischen – aktuelle Themen in der Richtlinienentwicklung

Christian Schlechtriem (christian.slechtriem@ime.fraunhofer.de),
Karsten Hohgardt (karsten.hohgardt@bvl.bund.de), Caren Rauert
(caren.rauert@uba.de)

Abstract

Experimentell bestimmte Bioakkumulationsfaktoren sind ein wichtiges Element der Bewertung stofflicher Risiken. Basis für die Durchführung von Bioakkumulationsstudien an Fischen ist die momentan in Revision befindliche Richtlinie OECD 305 (Flow-through fish test). Fischmetabolismusstudien liefern die Basis für Rückstandsdefinitionen und zur Bestimmung des Anreicherungspotentials von Pflanzenschutzmitteln und deren Metaboliten in Aquakulturprodukten. Im Vergleich zu anderen Nutztierarten, wie Wiederkäuer, Geflügel und Schweine, gibt es jedoch für Fische bislang keine Leitlinie zur Durchführung entsprechender Studien. Die Studienkonzepte zur Durchführung von Bioakkumulations- und Metabolismusstudien an Fischen werden beschrieben und ein Einblick in den aktuellen Stand der Richtlinienentwicklung gegeben.

1. Revision der Richtlinie OECD 305

1.1 Biokonzentrationsstudien

Bioakkumulation beschreibt die Anreicherung von Chemikalien im Organismus. Dabei wird die Aufnahme von Substanzen über die Nahrung (Biomagnifikation) von der direkten Anreicherung aus der abiotischen Umwelt (Biokonzentration) unterschieden. Experimentell bestimmte Bioakkumulationsfaktoren sind ein wichtiges Element der Risikobewertung chemischer Substanzen. Basis für die Durchführung von Biokonzentrationsstudien an Fischen ist die Richtlinie OECD 305 (Flow-through fish test). Seit der Konsolidierung dieser Richtlinie im Jahr 1996 wurden zahlreiche Substanzen getestet und dabei umfangreiche Erfahrungen durch die Prüflabore und Regulationsbehörden gesammelt. Die gewonnenen Erkenntnisse fließen nun in die Revision der Richtlinie ein.

Insbesondere der hohe Verbrauch an Versuchstieren bei der Chemikalienbewertung hat den Ruf nach vereinfachten Testmethoden verstärkt. Ein auf der Arbeit von Springer et al. 2008 basierendes minimierendes Testdesign wird in die Richtlinie aufgenommen und kann in Zukunft, falls bestimmte Kriterien erfüllt sind, als Alternative zur klassischen Biokonzentrationsstudie eingesetzt werden. Dabei sind weniger Probennahmezeitpunkte und die Option des Einsatzes nur einer einzelnen Testkonzentration vorgesehen. Die Berechnung der Biokonzentrationsfaktoren (BCF) erfolgt auf Basis eines kinetischen Einkompartiment-Modells. Aufgrund der relativ geringen Präzision der erzielten Ergebnisse sollte das minimierte Testdesign insbesondere zur Überprüfung QSAR basierter BCF-Werte dienen, die deutlich über oder unter den regulatorischen Triggerwerten liegen.

1.2 Biomagnifikationsstudien

Insbesondere für Chemikalien hoher Lipophilie ($\log P > 5$) stellt die Durchführung von Biokonzentrationsstudien häufig ein Problem dar. Die schlechte Wasserlöslichkeit lipophiler Substanzen beeinträchtigt die Einstellung stabiler Testkonzentrationen und kann unter bestimmten Bedingungen zu unpräzisen Messungen der Testsubstanz im Medium führen. Zudem reichern sich Chemikalien in der Umwelt mit steigender Lipophilie verstärkt über die Nahrungskette an, so dass den Biomagnifikationsprozessen eine höhere Beachtung geschenkt werden müsste. Für Chemikalien mit schlechter Wasserlöslichkeit wird daher zukünftig ein alternatives Testdesign zur Durchführung von Bioakkumulationsstudien auf Basis von Fütterungsexperimenten zur Wahl stehen. Ziel dieser Studien ist die Bestimmung eines Biomagnifikationsfaktors (BMF). Zukünftig werden somit zwei unterschiedliche Bioakkumulationsfaktoren in die Stoffbewertung eingehen. Im Rahmen des Revisionsprozesses der Richtlinie OECD 305 wird momentan geprüft, ob aus den Aufnahme- und Ausscheidungsdaten eine Umrechnung in BCF-Werte möglich ist, oder ob zukünftig eigene Triggerwerte zur Bewertung des Biomagnifikationsprozesses erforderlich werden.

1.3 Lipidnormalisierung von Bioakkumulationsfaktoren

Da eine klare Beziehung zwischen dem Bioakkumulationspotential organischer Substanzen und dem Grad der Lipophilie besteht, hat der Fettgehalt der Versuchstiere einen entscheidenden Einfluss auf die Konzentration akkumulierter Substanzen. Die Fettgehalte der Versuchstiere sollten daher in Zukunft stets zusammen mit den ermittelten BCF-Werten angegeben werden. Die Nutzung geeigneter Extraktionsverfahren zur Fettbestimmung ist dabei essentiell (Schlechtriem et al. 2009). Die Möglichkeit der Normalisierung auf einen durchschnittlichen Lipidgehalt (z.B. 5%) gewährleistet die Vergleichbarkeit von BCF-Werten aus unterschiedlichen Studien. Für die Berechnung von Biomagnifikationsfaktoren werden die Fettgehalte im Fischfutter und im Fischgewebe sowie das Fischwachstum berücksichtigt.

1.4 Ringtest

Die im Auftrag der OECD von den nationalen Umweltbehörden aus Deutschland (Umweltbundesamt), England (Environment Agency) und der Niederlande (RIVM) koordinierte und durch ein internationales Expertenteam unterstützte Revision der Richtlinie wird im Laufe des kommenden Jahres zum Abschluss kommen. Die Durchführung von Biomagnifikationsstudien gemäß der revidierten

Richtlinie wird momentan in einem internationalen Ringtest validiert. Neben den Testlabors für Fischstudien des Fraunhofer IME, Schmallenberg und der BASF, Ludwigshafen, nehmen weitere Labors aus den USA, Kanada, Japan, England, Frankreich, Norwegen und der Schweiz an der Studie teil.

Die revidierte Richtlinie OECD 305 wird es ermöglichen, die stoffspezifischen Expositionspfade der Testsubstanzen bei der Durchführung von Bioakkumulationsstudien stärker zu berücksichtigen. Die Komplexität von Biokonzentrationsstudien kann durch die Nutzung eines minimierten Testdesigns reduziert werden, soweit ein definierter Kriterienkatalog erfüllt ist. Neben der Reduktion von Kosten kann somit insbesondere ein geringerer Verbrauch an Versuchstieren erzielt werden.

2. Fischmetabolismusstudien

Fische (einschließlich Krusten- und Weichtiere) aus Aquakulturen hatten 2006 einen Anteil von 47% am gesamten Fischverzehr der Menschheit (FAO, 2009). Auf Grund des steigenden Anteils pflanzlicher Rohstoffe in kommerziellen Fischfuttermitteln, richtet sich das Interesse zunehmend auch auf die Bestimmung möglicher Rückstandsgehalte von Pflanzenschutzmitteln (PSM) in Fisch aus Aquakultur. Im Rahmen der Zulassung von PSM werden Metabolismus- und Fütterungsstudien an landwirtschaftlichen Nutztieren erforderlich, wenn ein Risiko der Aufnahme von Rückständen in tierischen Produkte nach Verfütterung belasteten Futters besteht (Anhänge II und III der Richtlinie 91/414/EWG). Die Europäische Kommission wird im Herbst 2011 im Rahmen der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 entsprechende Datenaufforderungen für Fische veröffentlichen, die nach einer Übergangsfrist von zwei Jahren wirksam werden. Basis für die Durchführung von Fütterungsstudien sind Metabolismusexperimente. Im Vergleich zu anderen Nutztierarten, wie Wiederkäuer, Geflügel und Schweine, gibt es jedoch für Fische bislang keine Leitlinie zur Durchführung entsprechender Studien. Ein Leitfaden für die Durchführung von Metabolismusstudien an Fischen wird momentan unter Leitung des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) entwickelt.

2.1 Ziel von Metabolismusstudien

Ziel von Metabolismusstudien ist es, die Anreicherung von PSM höherer Lipophilie ($\log P > 3$) in tierischen Produkten durch die Aufnahme kontaminierten Futters abzuschätzen und Metabolitenmuster zu identifizieren. Von Interesse sind dabei ausschließlich PSM, die zur Anwendung in potentiellen Futterpflanzen zugelassen sind. Metabolismusstudien werden mit radioaktiv markierten PSM durchgeführt, um die Detektion und Identifikation von Metaboliten zu ermöglichen. Auf Basis der erzielten Ergebnisse wird über die Notwendigkeit einer weiterführenden Fütterungsstudie zur Bestimmung von Rückstandshöchstgehalten entschieden. Fütterungsstudien sind nur dann erforderlich, wenn signifikante Rückstandsmengen an PSM in der Futtertrockenmasse auftreten und im Rahmen

von Metabolismusstudien Rückstände über 0.01 mg/kg in verzehrbaren tierischen Produkten erwartet werden können.

2.2 Fischmetabolismusstudie: Eine methodische Herausforderung

Metabolismus- und Fütterungsstudien sollten mit Fischarten durchgeführt werden, die zum menschlichen Verzehr geeignet sind und in Aquakulturanlagen kultiviert werden (z.B. Regenbogenforelle und Karpfen). Das Körpergewicht der Versuchstiere sollte der üblichen Marktgröße entsprechen, um die Verfügbarkeit ausreichender Probenmengen für die Metabolitenbestimmung zu gewährleisten. Im Vergleich zu Bioakkumulationsstudien, bei der die Anreicherung von Substanzen im Gesamtkörper untersucht wird, steht bei Metabolismusstudien ausschließlich die Akkumulation von PSM-Rückständen im tierischen Produkt (Muskelgewebe) im Mittelpunkt des Interesses. Die Untersuchung von Lebergewebe kann zusätzlich wichtige Informationen zur Identifikation von Metabolitenmustern liefern.

Die Durchführung von Metabolismusstudien an Fischen stellt eine methodische Herausforderung dar. Für eine Studie werden 5-10 Versuchstiere benötigt. Die verhältnismäßig großen Tiere müssen in Tankeinheiten ausreichender Größe möglichst unter Durchflussbedingungen gehalten werden, um die Akkumulation gelöster Testsubstanz und ausgeschiedener Metabolite im Wasser während der Metabolismusstudien zu vermeiden. Metabolismusstudien werden mit Versuchsfuttermitteln durchgeführt, die mit radioaktiv markiertem PSM angereichert sind. Während der Studien entstehen große Mengen radioaktiv kontaminierten Wassers, das durch eine leistungsstarke Filtertechnologie behandelt werden muss. Die Länge einer Metabolismusstudie hängt insbesondere von der erzielten Gewebekonzentration und der damit verbundenen Möglichkeit einer Metabolitenbestimmung ab. Nach Überprüfung der Art und Höhe der PSM-Rückstände im tierischen Produkt ist gegebenenfalls eine weitere Fütterungsstudie erforderlich. Fütterungsstudien werden in der Regel mit nicht radioaktiv markiertem Testmaterial und an einer größeren Gruppe von Tieren durchgeführt, um notwendige Daten zur Bestimmung von Rückstandshöchstgehalten in Lebensmitteln tierischer Herkunft ableiten zu können.

Fraunhofer IME ist momentan intensiv mit der Durchführung von Pilotstudien zur Überprüfung der technische Umsetzbarkeit von Metabolismusexperimenten mit Fischen befasst. Die Ergebnisse werden einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung der Leitlinie für Fischmetabolismusstudien leisten.

Die neue Leitlinie stellt zusammen mit der noch zu erarbeitenden Leitlinie zu Fütterungsstudien an Fischen ein wichtigen Beitrag zum Schutz der Verbraucher dar.



Referenzen

- Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2009). Lipid measurement. Contributions to the Revision of TG OECD 305. Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (IME), Schmallenberg, Germany.
- Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008). Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280
- OECD (1996). OECD Guideline for Testing of Chemicals 305: Bioconcentration: Flow-through Fish Test. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2009). The State of World Fisheries and Aquaculture 2008. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, ISBN 978-92-5-106029-2. Im Internet unter <http://www.fao.org> (ISSN 1020-5489).
- Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Aufhebung der Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates. ABl. L 309 vom 24.11.2009, S. 1.
- Richtlinie 91/414/EWG des Rates vom 15. Juli 1991 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln. ABl. L 230 vom 19.8.1991, S. 1.

Korrespondenzadresse:

Christian Schlechtriem
Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte
Ökologie (IME)
Postfach 12 60
D-57377 Schmallenberg