



Der *Hyalella azteca* Biokonzentrationstest (HYBIT) als alternative Methode für die Bioakkumulationsbewertung

Christian Schlechtriem (christian.slechtriem@ime.fraunhofer.de),
Verena Kosfeld (verena.kosfeld@ime.fraunhofer.de)

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME)

Zusammenfassung

Die regulatorische Bewertung der Bioakkumulation von Chemikalien basiert üblicherweise auf deren Potential zur Biokonzentration in Fischen. Mit der Entwicklung des *Hyalella azteca* Biokonzentrationstests (HYBIT) wurde eine standardisierte Testmethode entwickelt, die den Einsatz einer wirbellosen Testspezies, des Süßwasseramphipoden *H. azteca*, ermöglicht. Das Testprotokoll umfasst sowohl ein Durchfluss- wie auch ein semi-statisches Testdesign. Die mit dem Test gewonnenen Informationen können zur Unterstützung der standardmäßigen regulatorischen Bewertung der Bioakkumulation auf der Grundlage von BCF-Werten verwendet werden und somit dazu beitragen, den Einsatz von Wirbeltieren zu reduzieren. Eine neue OECD Test Richtlinie zum HYBIT ist in Vorbereitung.

Einleitung

Die Bewertung des Bioakkumulationspotenzials von Chemikalien in aquatischen Organismen ist ein wichtiger Bestandteil der Chemikalienregulierung im Rahmen unterschiedlicher Rechtsordnungen wie der Europäischen Chemikalienverordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH). Der am häufigsten verwendete Parameter zur Abschätzung des Bioakkumulationspotenzials von Chemikalien in Fischen ist der Biokonzentrationsfaktor (BCF). Der BCF stellt das Verhältnis zwischen der Gleichgewichtskonzentration einer Chemikalie im Organismus und deren Konzentration im Atmungsmedium, d.h. im Wasser, dar. Das Standardverfahren zur Bestimmung des BCF für die regulatorische Stoffbewertung ist der Biokonzentrations-Fischtest gemäß der OECD-Testrichtlinie (TG) 305 (OECD, 2012). Dieser In-vivo-Test ist nicht nur technisch schwierig, zeit- und kostenintensiv, sondern erfordert auch eine hohe Anzahl von Wirbeltieren (> 108 Fische) (de Wolf et al. 2007). Daher ist die Entwicklung verbesserter Teststrategien, die den 3R-Prinzipien folgen, erforderlich (Russel & Burch 1959; Mehlman et al. 1989). Fische als Versuchstiere könnten z.B. durch Nicht-Wirbeltiere ersetzt werden. Bislang fehlte jedoch ein Testsystem für Wirbellose, das die Schätzung von BCF-Werten ermöglicht. In aktuellen Studien (Schlechtriem et al. 2018; Kosfeld et al. 2020) konnte gezeigt werden, dass der Süßwasseramphipode *Hyalella azteca* ein hohes Potenzial für den Einsatz als Testorganismus im Rahmen von Biokonzentrationsstudien hat. Etwa 20 Substanzen mit unterschiedlicher Hydrophobizität (log Kow 0,7 - 7,8) wurden unter Durchflussbedingungen getestet, um Biokonzentrationsfaktoren zu bestimmen. Biokonzentrationsstudien mit *H. azteca* ergaben dabei lipidnormalisierte BCF-Werte, die eine deutliche Korrelation mit

den in der Literatur beschriebenen BCF-Werten für Fische aufweisen ($r^2 = 0,69$) (Schlechtriem et al. 2019). Die BCF-Werte von *Hyalella* können nach dem Standard-B-Kriterium (BCF > 2000) bewertet werden und ermöglichen damit die Vorhersage einer B- oder Nicht-B-Einstufung im Standard-Fischtest. Die Testmethode hat somit ein hohes Potenzial als alternative Methode für die Bioakkumulationsbewertung.



Abb. 1. Der Mexikanische Flohkrebs *Hyalella azteca* (Photo: Fraunhofer IME).

Der *Hyalella azteca* Biokonzentrationstest (HYBIT)

Ein standardisiertes Testprotokoll für den *Hyalella azteca* Bioconcentration Test (HYBIT) wurde am Fraunhofer IME im Rahmen des durch das European Chemical Industry Council finanzierte Projekt CEFIC-LRI ECO40 entwickelt. *H. azteca* ist ein epibenthischer Flohkrebs (Abb. 1), der in Nord- und Mittelamerika weit verbreitet ist und häufig für Ökotoxizitätsstudien mit und ohne Sediment verwendet wird. Die Süßwasser-Amphipoden lassen sich leicht im Labor züchten und sind das ganze Jahr über verfügbar. Aufgrund seiner hohen Reproduktionsrate und seines schnellen Wachstums kann der Amphipode *H. azteca* innerhalb weniger Wochen bis zur Erwachsenengröße aufgezogen werden, um den Bedarf an einer großen Anzahl an Organismen für Biokonzentrationstests zu decken. Das entwickelte Testprotokoll erlaubt die Durchführung von Biokonzentrationsstudien unter Durchflussbedingungen oder semi-statischer Exposition (Abb. 2).

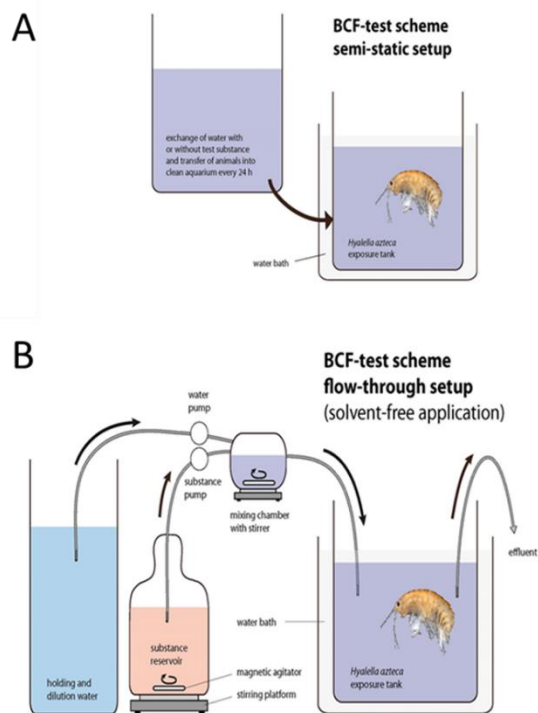


Abb. 2. HYBIT Ringtestprotokoll: Schematischer Überblick über den Versuchsaufbau des semi-statischen Tests (A) und des Durchflusstests (B).

Das HYBIT-Protokoll folgt weitgehend dem Testdesign des in der OECD TG 305-I (OECD 2012) beschriebenen Fischtests mit Exposition über das Wasser. Alle Tests bestehen aus 2 Phasen: der Expositionsphase (Aufnahme) und der Postexpositionsphase (Ausscheidung). Während der Aufnahmephase werden die Tiere unter möglichst konstanten Expositionsbedingungen gehalten. Damit ein Test gültig ist, muss die Konzentration der Prüfsubstanz im Versuchsbecken innerhalb von $\pm 20\%$ des Mittelwerts der während der Aufnahmephase gemessenen Werte liegen. *H. azteca* und Wasserproben werden im Laufe des Tests in bestimmten Abständen entnommen und analysiert, um schließlich die Aufnahme- und Ausscheidungsgeschwindigkeitskonstanten sowie die Bioakkumulationsfaktoren zu bestimmen. Der BCF wird als Verhältnis zwischen der Konzentration im Amphipoden und der gelösten Konzentration im Wasser im "Gleichgewicht" (BCF_{SS}) oder als Verhältnis der Aufnahme- und Ausscheidungsgeschwindigkeitskonstanten (BCF_K) berechnet. Zur Standardisierung der Berechnung von BCF-Werten kann das für den Fischtest entwickelte R-Paket *bcmfR* (OECD 2016) eingesetzt

werden. Der Lipidgehalt in *H. azteca* kann je nach Größe und Alter der Amphipoden variieren und ist im Vergleich zu den Lipidgehalten, die in den für Bioakkumulationstests verwendeten Fischen gemessen wurden, tendenziell niedriger. Der durchschnittliche Lipidgehalt der Versuchstiere in den Tests sollte daher gemessen werden, um die berechneten BCF-Werte auf einen einheitlichen Körperfettgehalt (z.B. 5 %) zu normalisieren. Auf diese Weise wird ein Vergleich der Ergebnisse aus unterschiedlichen Tests ermöglicht (Schlechtriem et al. 2012, OECD 2012).

Ringtest zum *Hyalella azteca* Biokonzentrationstest (HYBIT)

Die Validierung des Testprotokolls war erforderlich, um die Übertragbarkeit der Methoden (semi-statischer und Durchflussansatz) zu bestätigen und die Wiederholbarkeit der erzielten Ergebnisse nachzuweisen. Die Validierung erfolgte dabei in einem zweistufigen Verfahren: Die erste Phase umfasste einen Vortest (Screening-Ansatz) mit drei Laboren, um die Robustheit und Übertragbarkeit der Testprotokolle zu belegen. An der zweiten Phase (Hauptstudie) waren 11 Labore aus Frankreich, Italien, Deutschland und der Schweiz beteiligt, um die Variabilität der mit dem HYBIT erzielten Ergebnisse abzuschätzen. Die Versuchstiere für die Biokonzentrationstests wurden durch Laborzucht in den teilnehmenden Prüfeinrichtungen gewonnen. Es wurden drei Chemikalien mit unterschiedlichen Eigenschaften getestet. Bei den Testsubstanzen handelte es sich um Terbutryn (mäßig hydrophob; $\log K_{ow}$ 3,6), Prochloraz (hydrophob; $\log K_{ow}$ 4,4) und Hexachlorbenzol (hoch hydrophob; $\log K_{ow}$ 5,8). Terbutryn und Prochloraz wurden im semi-statischen Ansatz getestet. Prochloraz wurde zudem wie Hexachlorbenzol im Durchflusstest getestet. Die teilnehmenden Labore konnten Biokonzentrationsstudien nach dem semi-statischen oder dem Durchflussdesign durchführen und waren jeweils für die Durchführung der Tests wie auch für die Analyse der Chemikalien in den Wasser- und *Hyalella*-proben verantwortlich, die während der Biokonzentrationsstudien entnommen wurden.

Die Lipidnormalisierung der berechneten BCF-Werte wurde durchgeführt, um den Vergleich der in den unterschiedlichen Laboren erzielten Ergebnisse zu ermöglichen. Allerdings garantiert nur die Anwendung geeigneter Extraktionsverfahren die vollständige Extraktion der Gesamtlipide aus den gesammelten Testorganismen und somit eine korrekte Normalisierung der BCF-Werte. Daher war ein Standardprotokoll für Lipidmessungen Teil des Ringtestprotokolls. Die korrekte Anwendung des Extraktionsverfahrens in den verschiedenen Laboren wurde vor dem Ringversuch validiert.

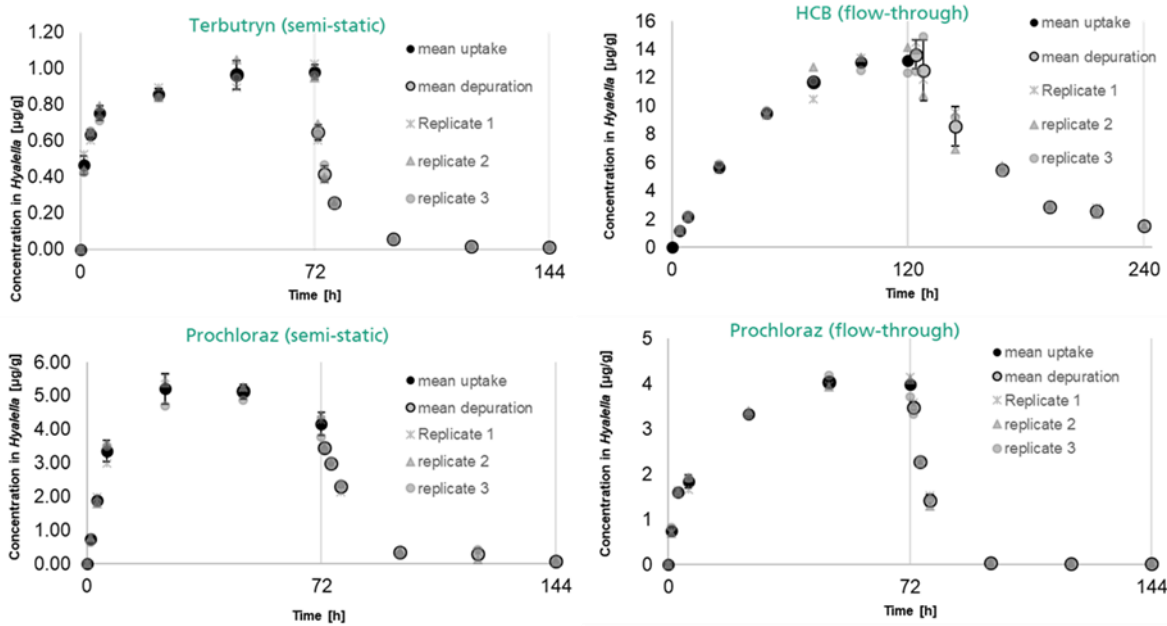


Abb. 3. Aufnahme- und Eliminationskinetik der im Ringtest eingesetzten Testsubstanzen (exemplarische Ergebnisse).

Alle im Rahmen des Ringtests durchgeführten Studien ermöglichten die Berechnung von kinetischen und „steady-state“ Biokonzentrationsfaktoren. Die Aufnahme- und Eliminationskinetik der eingesetzten Testsubstanzen ist in Abb. 3 exemplarisch dargestellt. Die nach den verschiedenen Protokollen (Durchfluss- und semi-statischer Test) erzielten Ergebnisse (BCFs) bestätigten weitgehend die Ergebnisse aus früheren Studien mit denselben Testsubstanzen (Schlechtriem et al. 2019, Kosfeld et al. 2020). Eine detaillierte Darstellung der Ringtest-ergebnisse wird in Kürze veröffentlicht.

Die Durchführung des Ringtests und die nun folgende Entwicklung einer neuen Testrichtlinie im Rahmen des OECD Test Guideline Programms werden durch die nationalen Koordinatoren aus Frankreich (INERIS) und Deutschland (UBA) sowie eine internationale Expertengruppe beratend unterstützt.

Schlussfolgerung und Ausblick

Der Ringtest hat bestätigt, dass der *Hyalella azteca* Biokonzentrationstest (HYBIT) als Alternative zum Fischtest gemäß OECD TG 305 geeignet ist. Die Übertragbarkeit des HYBIT Testprotokolls (semi-statischer und Durchflussansatz) sowie die Wiederholbarkeit der erzielten Ergebnisse wurden nachgewiesen, was die weiterführende Standardisierung der Testmethode unterstützt, die derzeit innerhalb der OECD erfolgt. Die Finalisierung der OECD Test Richtlinie zum HYBIT ist für das Jahr 2023 geplant.

Referenzen

de Wolf W., Comber M., Douben P., Gimeno S., Holt M., Léonard M., Lillicrap A., Sijm D., van Egmond R., Weisbrod A., Whale G. 2007. Animal use replacement, reduction, and refinement: Development of an integrated testing strategy for bioconcentration of chemicals in fish. *Integr Environ Assess Manag* 3: 3–17.

Mehlman M.A., Pfitzer E.A., Scala R.A. et al. 1989. A report on methods to reduce, refine and replace animal testing in industrial toxicology laboratories. *Cell Biol Toxicol* 5: 349–358.

Organisation for Economic Co-operation and Development. 2012. Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, France.

Organisation for Economic Co-operation and Development. 2016. Guidance Document to OECD Test Guideline 305: 2nd draft. Paris, France.

Kosfeld V., Fu Q., Ebersbach I., Esser D., Schulte A., Bischof I., Hollender J., Schlechtriem C. 2020. Comparison of alternative methods for bioaccumulation assessment: Scope and limitations of in vitro depletion assays with rainbow trout and bioconcentration tests in the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 39 (9): 1813–1825.

Russell W.M.S. and Burch R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, London.

Slechtriem C., Fliedner A., Schäfers C. 2012. Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of guideline OECD 305. *Environmental Sciences Europe* 24: 13.

Slechtriem C., Kampe S., Bruckert H.J., Bischof I., Ebersbach I., Kosfeld V., Kotthoff M., Schäfers C., L'Haridon J. 2019. Bioconcentration tests with fish and the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. Are the results predictive of bioconcentration in fish? *Environmental Science and Pollution Research* 26: 1628–1641.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Christian Schlechtriem

Fraunhofer IME

Auf dem Aberg 1

57392 Schmallenberg

E-Mail: christian.slechtriem@ime.fraunhofer.de