

# ANGEREICHERTE VERSUCHSDIÄTEN FÜR FISCHMETABOLISMUSSTUDIEN

## PREPARATION OF FORTIFIED EXPERIMENTAL DIETS FOR FISH METABOLISM STUDIES

### Hintergrund und Ziele

Im Rahmen der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln (PSM) werden zukünftig Metabolismusstudien an (Süßwasser-) Fischen erforderlich, wenn ein Risiko der Aufnahme von Rückständen in tierische Produkte nach Verfütterung belasteten Futters besteht. In Fischmetabolismusstudien soll dabei ein Standardfischfuttermittel verwendet werden, das auch in der kommerziellen Aquakultur zum Einsatz kommt. Bei der Herstellung der Versuchsfuttermittel sollte eine Methode angewendet werden, die den sicheren Einsatz der radioaktiv markierten Testsubstanzen gewährleistet. Bei schwach lipophilen Substanzen ( $\log K_{ow} < 5$ ) sind darüber hinaus Maßnahmen erforderlich, die verhindern, dass sich die Testsubstanz vor Aufnahme des Futters durch die Versuchstiere aus den Futterpellets herauslöst. Um die Produktion stabiler, homogener angereicherter Testfuttermittel zu gewährleisten, wurde am Fraunhofer IME ein Protokoll zur Herstellung angereicherter Versuchsdiäten entwickelt.

### Projektbeschreibung

Die Oberflächenanreicherung von Fischfutterpellets mit fettlöslichen Testsubstanzen erfolgt häufig durch Mischen der Pellets mit Fisch- oder Pflanzenöl, in dem das zu testende Pflanzenschutzmittel zuvor gelöst wurde. Alternativ kann die Testsubstanz in einem organischen Lösungsmittel auf die Pellets aufgesprüht werden. Dies erlaubt zudem die Ummantelung der angereicherten Pellets mit organischen Polymeren zur weiteren Stabilisierung der Testfuttermittel. Fischfuttermittel (4-6 mm) wurden unter Verwendung beider Methoden mit einem schwach lipophilen, radioaktiv markierten Pflanzenschutzmittel angereichert. Das Aufsprühen der organischen Lösungsmittel wurde mit einem modifizierten Rotorevaporator durchgeführt, der die sichere Anwendung der radioaktiv markierten Testsubstanz gewährleistete. Die über ein Lösungsmittel angereicherten Pellets wurden anschließend mit unterschiedlichen Mengen an Ca-Alginatgel ummantelt. Proben der mit den unterschiedlichen Methoden hergestellten Futtermittel wurden extrahiert und analysiert, um die Homogenität der

Testsubstanz in den behandelten Pellets zu bestimmen. Die Stabilität der angereicherten Pellets wurde in Wasserlöslichkeitsstudien untersucht, um das Herstellungsverfahren für angereicherte Testdiäten zu optimieren. In diesen bis zu 60 Minuten dauernden Studien wurde das Ausmaß der Lösungsverluste in Relation zur Behandlungsdauer bestimmt. Angereicherte Pellets, die zu den niedrigsten Lösungsverlusten führten, wurden in Fütterungsstudien an Regenbogenforellen und Karpfen getestet, um die Akzeptanz und den Nährwert des behandelten Futtermittels zu untersuchen.

### Ergebnisse

Die Verteilung der Testsubstanz in den angereicherten Futtermitteln war durch eine hohe Homogenität gekennzeichnet. Die durch Lösungsmittel angereicherten, nicht ummantelten Pellets zeigten innerhalb weniger Minuten starke Lösungsverluste. Diese Verluste konnten jedoch durch Öl- bzw. Alginatbehandlung der Pellets signifikant verringert werden. Die geringsten Verluste wurden durch eine gering dosierte Behandlung mit Ca-Alginatgel erzielt. Die mit dieser Methode behandelten Pellets wurden sowohl von Regenbogenforellen als auch von Karpfen in hohem Maße akzeptiert. Die Tiere zeigten die übliche Wachstumsleistung. Der Nährwert der angereicherten Pellets wurde durch die Alginatbehandlung offensichtlich nicht beeinträchtigt.

### Fazit

Ein Protokoll wurde entwickelt, das die Herstellung stabiler und homogener angereicherter Versuchsdiäten für Fischmetabolismusstudien gewährleistet. Das Fraunhofer IME ist momentan an der Entwicklung einer Richtlinie für Fischmetabolismusstudien beteiligt. Das entwickelte Protokoll liefert wichtige Hinweise für die Herstellung von Versuchsdiäten für solche Studien.

### Auftraggeber / Sponsor

Die Untersuchungen wurden Fraunhofer-intern und durch Aufträge aus der Industrie finanziert.



## Background and aims

Metabolism studies in (freshwater) fish will be necessary in the future for the authorization of plant protection products (PPPs) used in crops that are fed to farmed fish. Standard fish food of suitable composition (as used in commercial fish farming) should also be used in metabolism studies, and the spiking method must ensure the safe use of the radiolabelled test item. For moderately lipophilic PPPs ( $\log K_{ow} < 5$ ), appropriate measures are required to prevent the test substance leaching from the surface of the spiked pellets prior to ingestion by the fish. We therefore developed a feed preparation protocol to ensure the production of stable and homogeneously-fortified test diets for fish metabolism studies.

## Approach

When a test substance is soluble in triglycerides, one suitable top dressing method for fish feed pellets is to dissolve the test substance in a small amount of fish oil or vegetable oil before mixing with the feed. Alternatively, the feed can be spray coated with the test substance using a suitable organic solvent. The latter is advantageous because solvent spiked pellets can be coated after fortification with different organic matrices to obtain sufficiently stable test diets. Both approaches were tested in this study.

Fish feed pellets (4-6 mm) were fortified with a radiolabelled, sparingly lipophilic pesticide using the oil and solvent spiking procedures. Solvent spiking was carried out with a modified rotary evaporator allowing the safe use of radiolabelled materials. Solvent-spiked pellets were coated with different levels of calcium alginate. Aliquots of the spiked feed were extracted and analyzed to determine the homogeneity of the test substance in the treated pellets. The stability of the spiked feed was investigated in leaching studies in order to determine the optimal preparation method for fortified experimental diets. These experiments lasted up to 60 minutes, and estimated the extent of test substance loss from the pellet surface into the water column as a function of exposure time. Coated pellets

with the greatest stability (minimal leaching) were then tested in feeding studies using rainbow trout and common carp to investigate their acceptance and nutritional value.

## Results

The test substance was found to be homogeneously distributed in the fortified pellets regardless of the spiking method. Solvent-spiked pellets without a coating leached much of the test substance into the water column within a few minutes whereas these losses were significantly reduced by oil or alginate coating (moderate calcium alginate levels produced the best results). Spiked pellets treated in this manner were readily accepted by rainbow trout and carp. All the animals grew normally, showing that the nutritional value of the fortified pellets was unaffected by the coating procedure.

## Conclusion

A feed preparation protocol was developed that ensures the production of stable and homogeneously-fortified test diets for fish metabolism studies. Fraunhofer IME is currently involved in the development of a guidance document for fish metabolism studies coordinated by Germany's Federal Office of Consumer Protection and Food Safety. The feed preparation protocol will provide guidance for the preparation of suitable experimental diets in such studies.

## Contact / Ansprechpartner

Dr. Christian Schlechtriem  
Tel: +49 2972 302 - 186  
christian.schlechtriem@ime.fraunhofer.de

*Figure 1: Rotary evaporator suitable for radiolabelled material.*

*Figure 2: Common carp (Cyprinus carpio).*