

Ecotoxiciteitstest: Overlevingstest op vis (diverse species)

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	3
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	3
4.1	<i>Apparatuur</i>	3
4.2	<i>Infrastructuur</i>	4
4.3	<i>Materiaal</i>	4
5	REAGENTIA en OPLOSSINGEN	5
5.1	<i>Verdunningswater</i>	5
5.2	<i>Referentiestof</i>	5
5.3	<i>Oplossingen</i>	5
6	PROCEDURE	7
6.1	<i>Voorafgaande acties</i>	7
6.2	<i>Monstervoorbereiding</i>	7
6.3	<i>Metten</i>	8
6.4	<i>Testuitvoering</i>	8
7	KWALITEITSCONTROLE	9
8	BEREKENING & RAPPORTERING	9
9	REFERENTIES	10

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze methode is geschikt om de acute toxiciteit voor *vissen* te bepalen van:

- Chemische stoffen die in water oplosbaar zijn onder de testcondities of die in een stabiele suspensie of dispersie blijven onder de testcondities.
- Diverse watermatrices: afval-, oppervlakte-, drink-, grondwater, ef-/influent, absorptievloeistoffen, uitloging, waterige oplossing,...

Deze bepaling is een onderdeel van de ecotoxicologische beoordeling van (afval)waters en chemische stoffen in water, namelijk de meting van de toxiciteit voor het trofische niveau van de hogere vertebrata.

2 PRINCIPE

De acute toxiciteitstest op vissen berust op het meten van de sterfte van vissen na blootstelling aan een verdunningsreeks van een waterige oplossing of staal. De test heeft tot doel om de eventuele acute schadelijkheid van het staal voor deze organismen te meten en te kwantificeren. De effecten worden uitgedrukt in termen van LC50 voor sterfte. Eventueel kunnen ook NOEC en LOEC vermeld worden, en de laagste concentratie die 100% effect veroorzaakt.

De test kan in 2 fasen worden uitgevoerd:

- a) een preliminaire test waarbij de effectrange wordt bepaald via grovere verdunningen (bv. log 10)
- b) een finale test waarbij binnen de effectrange verfijnde verdunningen worden gebruikt (bv. log 2.2)

3 OPMERKINGEN

Volgende definities zijn van toepassing:

- *Letaliteit*: een vis wordt als dood beschouwd indien aanraking van de staartwortel geen reactie teweeg brengt en er geen ademhalingsbewegingen zichtbaar zijn.
- *LC50* (50 % letale concentratie): dit is de concentratie waarbij 50% van de vissen in een testgroep sterft binnen de vooraf bepaalde blootstellingsperiode.
- *NOEC* (no observed effect concentration): dit is de hoogste testconcentratie die GEEN statistisch significante sterfte veroorzaakt in vergelijking met de controlegroep.
- *LOEC* (lowest observed effect concentration) : dit is de laagste testconcentratie die WEL statistisch significante sterfte veroorzaakt in vergelijking met de controlegroep.
- *Referentiestof*: een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de gevoeligheid van de geteste soort onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate veranderd is.

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 APPARATUUR

Gangbare laboratoriumapparatuur

- Zuurstofmeter.
- Thermometer.
- pH-meter.
- Uitrusting voor de bepaling van de hardheid van het water.
- Weegschaal
- Beluchtingsysteem

4.2 INFRASTRUCTUUR

Lokaal met regelbaar dag/nacht ritme en regelbare temperatuur. Beluchtingsinstallatie met voldoende vertakkingen naar de aquaria.

4.3 MATERIAAL

Materiaal dat rechtstreeks in contact komt met de testoplossingen is bij voorkeur geheel van glas.

Verduunningsmateriaal: glazen recipiënten, wegwerppipetten, automatische pipetten

Testaquaria: glazen aquaria met een inhoud van 7 l, met losse deksels.

Organismen: Verschillende soorten vissen kunnen gebruikt worden voor deze acute overlevingstest. **Voor de beoordeling van afvalwaters wordt in Vlaanderen de vissoort *Oncorhynchus mykiss* gebruikt.** De volgende instructies zijn van toepassing voor juveniele en volwassen exemplaren van de vissoorten die aanbevolen worden voor de acute vistest, bijvoorbeeld de zebravis, *Danio rerio*, de karper, *Cyprinus carpio* en de regenboogforel *Oncorhynchus mykiss*.

Elke partij vissen moet organismen van eenzelfde soort en vergelijkbare leeftijd (~ lengte klasse) bevatten. De kwaliteit van de geleverde vissen moet door de leverancier gedocumenteerd worden. Toegekomen ladingen worden in quarantaine geplaatst. De bedoeling is om de gezondheidstoestand van de vissen te volgen en enkel wanneer aan onderstaande voorwaarden wordt voldaan mogen de vissen gebruikt worden voor toxiciteitstesten.

Na 30 minuten acclimatisatie - waarbij de plastic transportzakken gesloten ondergedompeld worden in het quarantaineaquarium - worden de toegekomen vissen vrij gelaten. Na een gewenningsperiode van 48 uur volgt een quarantaineperiode van 7 dagen. De sterfte van de vissen wordt dagelijks genoteerd gedurende deze 7 dagen. Na deze 7 dagen quarantaine wordt de conditie van de vissen per aquarium getoetst:

- Sterfte > dan 10%, batch wordt afgekeurd; Sterfte < 5%: batch wordt vrijgegeven voor tests.
- Sterfte tussen 5 en 10%,: 2de quarantaineperiode van 7 dagen. Wanneer tijdens deze 2de periode > 5% sterfte: batch wordt afgekeurd, bij < 5 % sterfte: batch wordt goedgekeurd.

Nadat een aquarium met vissen goedgekeurd is, komen deze organismen in stock en kunnen zij voor tests gebruikt worden. Men zorgt ervoor dat de stock van vissen beperkt blijft, (maar wel voldoende: een definitieve test wordt bij voorkeur met vissen van eenzelfde partij uitgevoerd dan de preliminaire test). Vissen worden maximum 6 maanden in stock gehouden en nadien verwijderd. Vissen van verschillende partijen mogen nooit gedurende de periode van quarantaine en stockage samengebracht worden.

Tabel 1: Aanbevelingen voor onderhoud en specificaties van enkele vissoorten, zoals deze ondermeer door de OECD-richtlijn 203 aanbevolen worden.

Aanbevolen soort	lengte klasse (cm)	temper. range (°C)	lichtperiode (uur)	voedseltype
Brachydanio rerio Zebravis (zebrafish) (Teleostei, Cyprinidae)	2.0 ± 1.0	21-25	12-16	vlokken
Cyprinus carpio Karper (carp) (Teleostei, Cyprinidae)	3.0 ± 1.0	20-24	12-16	vlokken of karper korrel
Poecilia reticulata Guppie (guppy) (Teleostei, Poeciliidae)	2.0 ± 1.0	21-25	12-16	vlokken
Oncorhynchus mykiss Regenboogforel (rainbow trout) (Teleostei, Salmonidae)	5.0 ± 1.0	13-17	12-16	forel korrel

5 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

5.1 VERDUNNINGSWATER

Elk water, zowel kraanwater, natuurlijk als synthetisch water dat geschikt is voor de stock van vissen kan voor deze test worden gebruikt. Om de test zo reproduceerbaar mogelijk te maken is het echter aanbevolen om synthetisch medium te gebruiken.

Bij voorkeur ligt de pH tussen 6,0 en 9,0 en de totale hardheid tussen 10 en 300 mg/l (uitgedrukt als CaCO₃).

Adaptatie: Vóór het gebruik in de test moeten de vissen gedurende ten minste 7 dagen gehouden worden in een water dat vergelijkbaar (kwaliteit en temperatuur) is met het testwater.

5.2 REFERENTISTOF

Er worden omwille van ethische redenen zo weinig mogelijk vissen als proefdier gebruikt. Het uitvoeren van een aparte test op een referentiestof is daarom niet aangeraden.

5.3 OPLOSSINGEN

Om ethische redenen worden zo weinig mogelijk vissen als proefdier gebruikt. De keuze van de testverdunningen wordt daarom bij voorkeur gebaseerd op historische gegevens of gegevens op andere soorten. Het kan bv. voldoende zijn om aan te tonen dat de vis minder gevoelig is dan een van de andere soorten: het volstaat dan enkel een limiettest uit te voeren bij de concentratie gelijk

aan de LC50 van de tot dan toe meest gevoelige soort. Is er minder dan 50% sterfte bij deze concentratie, dan is bewezen dat de vis minder gevoelig is.

Een limiettest bij 100% afvalwater waarbij geen sterfte optreedt, is voldoende om te bewijzen dat het afvalwater niet acuut toxisch is voor vissen.

De verdunningen worden kort voor het begin van de test bereid (max. 6 uur voor de start).

Voor zuivere stoffen:

Er wordt een stockoplossing met de gewenste concentratie aangemaakt door een afgewogen hoeveelheid op te lossen of te mengen in ultra puur water. Stockoplossingen van in water slecht oplosbare stoffen kunnen worden bereid door ultrasonische dispersie of, zo nodig, door gebruik van organische oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen. De uiteindelijke concentratie van dergelijke hulpstoffen in de test is bij voorkeur niet hoger dan 0,1 mg/l.

De gekozen testconcentraties worden bereid door de stockoplossing te verdunnen (diluties) met dilutiemedium dat op voorhand belucht werd met luchtbellen en op kamertemperatuur is (18-22°C).

De concentraties voor de preliminaire test zijn log 10 verdunningen met maximale concentratie 1g/l. In de finale test wordt meestal een verdunningsfactor van 2 gebruikt. De concentratiereeks voor de finale test wordt gekozen op basis van de resultaten van de preliminaire test zodanig dat (bij voorkeur) 0 % effect in de laagste en 100 % effect in de hoogste concentraties optreedt, na 24-96 uur blootstelling. Via een reeks tussenliggende concentraties (bij voorkeur minstens 3 met een positieve concentratie/effect relatie) kan de EC50-waarde na 24-en/of-48-96 uur berekend worden. Naast de verdunningsreeks wordt een controletest (= medium zonder teststof) mee uitgevoerd. Indien hulpstoffen worden gebruikt moet, naast deze blanco controle, ook een solventcontrole getest worden (= medium met hulpstof, maar zonder teststof. De concentratie hulpstof = hoogste concentratie die in de test gebruikt wordt. Bij voorkeur wordt dezelfde concentratie in alle testrecipiënten gebruikt).

Voor afvalwaters of andere waterige milieustalen:

De stalen steeds bewaren in het donker bij 4°C. De testen worden bij voorkeur opgestart binnen 48 h na staalname (ISO11348), maar een marge tot 4 dagen wordt om praktische redenen getolereerd, op voorwaarde dat het staal correct bewaard wordt. Indien de test pas later kan uitgevoerd worden is het toegelaten het afvalwaterstaal in te vriezen ($\leq -18^{\circ}\text{C}$). Vermeld wel steeds de datums van aankomst en van testuitvoering in het rapport, en de bewaarcondities.

De gewenste verdunningen worden aangemaakt in dilutiewater (zie hoger). Standaard wordt een test op milieustalen (behalve op geconcentreerde extracten) uitgevoerd op de volgende concentraties: 100- 50 – 25 - 12.5 % staal. Indien de resultaten van deze reeks toelaten om een EC50 waarde vast te leggen (i.e. wanneer er 2 tot 3 testconcentraties op de helling van de concentratie-effectcurve liggen) of wanneer de 100% concentratie geen effect teweegbrengt, is er geen vervolgstest nodig. Is dit niet het geval dan wordt een tweede test uitgevoerd met verdunningen binnen de effectrange. De concentraties worden zodanig gekozen dat zij (bij voorkeur) na 24 uur geen sterfte veroorzaken in de laagste en het maximale effect in de hoogste testconcentratie. Via een reeks tussenliggende concentraties (bij voorkeur minstens 3) kan de EC50-waarde na 96 uur berekend worden. Indien geen EC50 bepaald kan worden is het nuttig om NOEC en LOEC waarden te bepalen. Indien er helemaal geen effect wordt veroorzaakt door het waterstaal wordt dit als niet toxisch aangegeven.

Als blanco-controle wordt dilutiewater gebruikt.

Indien extractieprocedures op het oorspronkelijke staal worden uitgevoerd, wordt dilutiewater op identieke wijze behandeld en wordt dit behandelde dilutiewater als methode-controle meegetest om de eventueel door de behandeling geïntroduceerde toxiciteit te meten.

Algemeen

Meet na de bereiding zowel in de controles als in de testdiluties de pH, **temperatuur** en het zuurstofgehalte.

De test wordt normaliter uitgevoerd zonder correctie van de pH. Indien de pH sterk schommelt of verandert tijdens de test, wordt geadviseerd om de test te herhalen met gecorrigeerde pH en ook deze resultaten in het rapport te vermelden. In dat geval wordt bij voorkeur de pH-waarde van de stockoplossing aangepast en gelijk gemaakt aan de pH-waarde van het medium met HCl of NaOH. Deze pH-correctie moet zodanig gebeuren dat de concentratie van de teststof in de stockoplossing niet in belangrijke mate wordt gewijzigd. Indien tengevolge van de correctie toch een chemische reactie of fysische neerslag van de teststof mocht optreden, dan dient dit expliciet te worden vermeld in het rapport.

6 PROCEDURE

6.1 VOORAFGAANDE ACTIES

- Tijdig de stock van vissen controleren en de nodige hoeveelheden vissen aankopen zodat de testorganismen tenminste **1 week (maar veiligheidshalve 3 weken)** kunnen adapteren aan de nieuwe omstandigheden.
- De volgende gegevens moeten op de laboformulieren vermeld worden: studienummer, referentienummer van het monster, speciesinformatie (batchnummer), aantal organismen per concentratie, hoeveelheid testoplossing per organisme, tijdsduur van de test, type van medium, lichtcyclus en vooropgestelde temperatuur.

6.2 MONSTERVEROEBEREIDING

De monsterveroebereiding is afhankelijk van het type water of stof dat getest moet worden.

- Eventueel zijn extracties mogelijk.
- **Randvoorwaarden meten: meet zuurstof en pH in alle testverduunningen.**
- **(voor waterstalen is het ook belangrijk de conductiviteit, ammoniumgehalte en chloriden van het oorspronkelijke staal te meten).**
- **De toegelaten ranges voor deze parameters staan hieronder vermeld. Bij overschrijding van deze voorwaarden kunnen effecten op de mortaliteit verwacht worden. Overschrijdingen moeten duidelijk in het rapport vermeld worden.**

Testorganisme	pH	Zuurstof (mg/l)	geleidbh. (µS/cm)	chloride (mg/l)	ammonium (mg/l bij pH 8)
<i>Oncorhynchus</i>	6.0 – 9.0	> 5	< 22000	< 5000	< 18

- Eventueel wordt de pH aangepast (zie hoger).
- Eventueel wordt het staal gefilterd indien de invloed van zwevend deeltjes niet wordt mee geëvalueerd.

- Eventueel wordt het staal belucht indien het zuurstofgehalte lager is dan 7 mg/l. Verdunningen worden bereid zoals boven aangegeven.

6.3 METEN

pH, zuurstof, conductiviteit, temperatuur.

6.4 TESTUITVOERING

Hieronder wordt het statisch systeem beschreven (geen vloeistofverversing gedurende de 96 uur durende test). Indien testoplossingen tijdens de blootstellingsperiode - omwille van hun instabiliteit - vernieuwd moeten worden, wordt de frequentie afgestemd op het productverlies zodat bij voorkeur de concentraties boven 80% blijven van de nominale waarde.

Blootstellingscondities:

De blootstellingsduur bedraagt 96 uur.

Ten minste 7 dieren worden getest in iedere concentratie.

Per 2g dier wordt tenminste 1 l testoplossing gebruikt, met een minimum van 4 liter per 7 organismen.

De testaquaria worden tijdens de test continu belucht met perslucht en losjes afgesloten met een plastic doorzichtig deksel.

Een licht-donker cyclus met een fotoperiode tussen 12 en 16 uur.

De testtemperatuur van het water moet aangepast worden aan de species maar moet voor de meeste soorten tussen 20° en 24°C liggen, **voor de forel ligt deze tussen 13-17°C**; voor iedere afzonderlijke test moet de temperatuur evenwel constant blijven binnen een range van 2°C.

De dieren worden niet gevoederd tijdens de test.

Testuitvoering

De testoplossingen moet onmiddellijk voor het starten van de proef worden bereid (maximaal 6 uur op voorhand).

- De pH, temperatuur en zuurstofconcentratie van de controle en testoplossingen meten en noteren.
- Neem voor elke concentratie het nodige aantal aquaria en nummer ze eenduidig.
- Vul ieder aquarium met de nodige hoeveelheid testwater.
- Plaats in elk aquarium het gewenste aantal vissen van de gewenste soort en van een goedgekeurde partij.
- Noteer startdatum en -uur en voor elke concentratie: de nummers van de aquaria, het aantal liters en vissen per recipiënt en eventuele opmerkingen.
- De vissen worden na de eerste 2 à 4 uur en ten minste om de 24 uur gecontroleerd op sterfte. Dode vissen worden, zodra ze zijn opgemerkt, verwijderd en de sterfte wordt genoteerd. Zichtbare afwijkingen (evenwichtverlies, zwemgedrag, ademhaling, pigmentatie, ...) worden ook genoteerd.
- Meet elke dag de temperatuur, pH en zuurstofconcentratie van de verschillende recipiënten en noteer de resultaten.
- Verwijder de dieren en de oplossingen op gepaste wijze.
- Deponeer de gecontamineerde afwas bij toxische afwas of niet gecontamineerd materiaal als normale afwas.

7 KWALITEITSCONTROLE

Tijdens de test

Enkel goedgekeurde vissen mogen gebruikt worden (~~zie SOP-TVISV003~~). i.e. de sterfte na 7 dagen quarantaine met < 5%. Bij sterfte tussen 5-10% kan eventueel een 2^{de} periode van 7 dagen quarantaine worden toegelaten. Indien er geen bijkomende sterfte > 10% van het oorspronkelijke aantal optreedt in deze periode kunnen de vissen voor testen gebruikt worden. Batches van vissen met > 10% sterfte tijdens de eerste 7 dagen quarantaine worden bij voorkeur niet gebruikt.

De sterfte in de controlegroepen mag aan het einde van de test niet hoger zijn dan maximum 1 vis. De zuurstofconcentratie moet gedurende de gehele test hoger blijven dan 60% van de verzadigingswaarde voor lucht.

Eerstelijnscontrole

- De herkomst van de organismen moet getraceerd kunnen worden.
- De quarantaine en stockage van de organismen moet via een logboek opgevolgd worden.
- De gezondheid van de organismen moet gedocumenteerd worden.

8 BEREKENING & RAPPORTERING

Het percentage sterfte na 24, 48, 72 en 96 uur wordt voor elke concentratie berekend.

Een grafiek met het cumulatieve percentage sterfte in functie van de concentratie voor 96 uur blootstelling wordt opgesteld.

De EC50-waarde na 96 uur wordt berekend via een gepaste statistische methode.

Wanneer geen EC50 waarde kan berekend worden, is het nuttig NOEC en LOEC te bepalen indien mogelijk. Wanneer er geen effecten worden waargenomen moet men aangeven dat het staal geen toxische effecten veroorzaakt voor de testorganismen binnen de testconcentratierange en de gebruikte blootstellingstijd. Indien 2 opeenvolgende concentraties met een onderlinge verhouding van 2.2 slechts 0 en 100 % immobilisatie geven, dan zijn deze waarden voldoende om aan te geven in welk gebied de LC₅₀ ligt.

Noteer ook de laagste concentratie die **resulteert in** 100% effect (indien mogelijk).

Indien mocht blijken dat de stabiliteit of homogeniteit van de teststof niet kan worden gehandhaafd, moet dit duidelijk worden vermeld en is voorzichtigheid geboden bij de interpretatie van de resultaten.

RAPPORTERING

Indien mogelijk moet het testrapport het volgende bevatten:

- samenvatting van de resultaten
- gegevens over het testorganisme (wetenschappelijke naam, leverancier, behandeling...)
- beschrijving van het testsysteem en de condities
- lijst van de gebruikte concentraties
- alle beschikbare gegevens over de stabiliteit van de teststof
- in geval van chemische analyses: toegepaste methoden en resultaten
- herkomst van het verdunningswater alsmede de gemeten fysico-chemische kenmerken
- concentraties van eventuele hulpstoffen
- voor moeilijk oplosbare stoffen de methode voor de bereiding van de stam- en testoplossingen
- de testprocedure en verdere details (testduur, beluchting, temperatuur, ...)
- naam en resultaten van de referentiestof indien gebruikt
- vermelding of aan de kwaliteitscriteria is voldaan

- vermelding van afwijkingen ten opzichte van het studieplan
- hoogste testconcentratie die geen sterfte veroorzaakte
- laagste testconcentratie die 100% sterfte veroorzaakte
- cumulatieve mortaliteit in de verschillende concentraties en groepen op de aanbevolen waarnemingstijden
- de LC₅₀-waarden op elk van de aanbevolen waarnemingstijden (met zo mogelijk de 95% betrouwbaarheidsintervallen). De LC50 waarde voor 96 uur blootstellingstijd wordt gebruikt voor de classificatie van afvalwaters en chemische stoffen.
- voor afvalwaters wordt LC50 ook omgerekend naar aantal toxische eenheden (TE).
- effect in de hoogste testconcentratie, laagste testconcentratie die 100% effect veroorzaakt (indien van toepassing).
- grafiek van deze concentratie/responspercentage-curve aan het einde van de test
- statistische procedures voor de bepaling van de LC50-waarden
- meetgegevens van het zuurstofgehalte, de pH-waarde en de temperatuur van de testoplossingen voor elke 24 uur.
- Eventuele afwijkingen van de hier beschreven procedure
- Voor afvalwaters: eventueel de interpretatie volgens het Vlaamse beoordelingskader voor afvalwaters*:
 - < 1 TE: geen acute toxiciteit
 - 1-10 TE: lage acute toxiciteit
 - 10-100 TE: acute toxiciteit
 - > 100 TE: hoge acute toxiciteit

Vermeld duidelijk dat het resultaat enkel een beoordeling van de acute toxiciteit van het afvalwater voor *Oncorhynchus* inhoudt.

* De finale beoordeling van de toxicologische kwaliteit van een afvalwater is gebaseerd op het resultaat van 4 biotesten (microtox (inhibitie van bioluminescentie na 30 min blootstelling), algen (effecten op groei na 72 uur blootstelling), daphnia (effecten op mobiliteit na 48 uur blootstelling) en forel (sterfte na 96 uur blootstelling)). Het resultaat van de meest gevoelige test wordt gebruikt om het afvalwater finaal te klasseren.

9 REFERENTIES

- OECD guidelines for testing chemicals N° 203 (1992) Fish acute toxicity test.
- ISO 7346 (1996) Determination of the acute lethal toxicity to a freshwater fish (*Brachydanio rerio*).