

Ecotoxiciteitstest: Overlevingstest op forel

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	3
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	4
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
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	6
6.1	<i>Voorafgaande acties</i>	6
6.2	<i>Monstervoorbereiding</i>	6
6.3	<i>Metten</i>	7
6.4	<i>Testuitvoering</i>	7
7	KWALITEITSCONTROLE	8
8	BEREKENING & RAPPORTERING	8
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.

De test kan worden uitgevoerd op een verdunningsreeks wanneer het doel is om de effectwaarden voor de concentratie-effectrelatie te bepalen. De test kan ook als limiettest worden uitgevoerd indien enkel de ernst van het effect bij een vooropgestelde concentratie moet beoordeeld worden. **Voor de beoordeling van afvalwaters wordt de limiettest bij 100% afvalwater uitgevoerd.**

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 monster. De test heeft tot doel om de acute schadelijkheid van het staal voor deze organismen te meten en eventueel te kwantificeren. De effecten worden uitgedrukt als:

- % effect in de limiettest **met 100% afvalwater** na 72 h of;
- in termen van LC_{50} voor sterfte **na 96 h blootstelling**. {}

Testen op verdunningsreeksen kunnen 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)

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.
- LC_{50} (50 % letale concentratie): dit is de concentratie waarbij 50% van de vissen in een testgroep sterft binnen de vooraf bepaalde blootstellingsperiode.

{}
}

- *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.
- *Limiettest*: in de test worden enkel controles en 1 testconcentratie gebruikt.

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 APPARATUUR

Gangbare laboratoriumapparatuur

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

4.2 INFRASTRUCTUUR

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

4.3 MATERIAAL

Verduunningsmateriaal: glazen recipiënten, wegwerppipetten, automatische pipetten

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

Organismen: voor de beoordeling van afvalwaters wordt in Vlaanderen de vissoort *Oncorhynchus mykiss* gebruikt. {}

Elke partij vissen moet organismen van eenzelfde soort en vergelijkbare leeftijd (~ lengteklasse) 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%: 2^{de} quarantaineperiode van 7 dagen. Wanneer tijdens deze 2^{de} 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 testen 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 van verschillende partijen mogen nooit gedurende de periode van quarantaine en stockage samengebracht worden, **en voor één test worden ook steeds organismen van dezelfde partij gebruikt.**

Tabel 1: Aanbevelingen voor onderhoud en specificaties zoals deze door de OECD-richtlijn 203 aanbevolen worden.

Aanbevolen soort	lengte klasse (cm)	temper. range (°C)	lichtperiode (uur)	voedseltype
<i>Oncorhynchus mykiss</i> 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, bijvoorbeeld viswater zoals beschreven in OECD 203 of ISO 7346.

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 tenminste 7 dagen gehouden worden in een water dat vergelijkbaar (kwaliteit en temperatuur) is met het **verdunningstest**water.

5.2 REFERENTIESTOF

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.

{ }

Voor afvalwaters of andere waterige milieumonsters:

De stalen steeds bewaren in het donker in de koelkast (1-5°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 (≤ -18°C). Vermeld wel steeds de datums van aankomst en van testuitvoering in het rapport, en de bewaarcondities.

Voor de beoordeling van afvalwater wordt enkel een limiettest uitgevoerd met 100% afvalwater, tenzij de conductiviteit te hoog is. In dat geval wordt een limiettest op 50% afvalwater uitgevoerd tenzij ook dan de conductiviteit nog te hoog is. In dat geval wordt een acute toxiciteitstest uitgevoerd op een zoutwatervis (tarbot bv.).

Indien een EC₅₀ waarde {} bepaald moeten worden wordt een verdunningsreeks aangemaakt. De gewenste verdunningen worden aangemaakt in dilutiewater (zie hoger). Standaard wordt een test op milieumonsters {} uitgevoerd op de volgende concentraties: 100 - 50 – 25 - 12.5 – 6.25 % 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 vervolgtest nodig. Is dit niet het geval dan wordt eventueel een tweede test uitgevoerd met verdunningen binnen de effectrange. De concentraties worden zodanig gekozen dat zij (bij voorkeur) na 96 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. {}

Als blanco-controle wordt dilutiewater gebruikt.

{}
 {}

Algemeen

- Meet in de controles en in de testoplossingen de pH, temperatuur en het zuurstofgehalte (zie onder §6.2).{}
 {}

6 PROCEDURE

6.1 VOORAFGAANDE ACTIES

- Tijdig de stock van vissen controleren en de nodige hoeveelheden vissen aankopen – veiligheidshalve 3 weken vooraf, zodat de testorganismen in quarantaine gehouden kunnen worden en vervolgens tenminste 1 week kunnen adapteren aan de lokale omstandigheden en het verdunningswater.
- Bepaal het gemiddeld gewicht van de vissen die je voor een test gaat gebruiken
- 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 MONSTERVEROBEREIDING

De monsterveroebereiding is afhankelijk van het type monster dat getest moet worden.

{}
 {}

- Randvoorwaarden meten: meet zuurstof en pH in alle testoplossingen. Voor afvalwatermonsters is het ook belangrijk om conductiviteit, ammoniumgehalte en chloriden van het oorspronkelijke monster 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 **indien deze buiten de aangegeven range ligt.**
- **Indien het zuurstofgehalte lager is dan 5 mg/l wordt het monster enkele uren belucht vooraleer de test op te starten.**
- **Indien de conductiviteit te hoog is wordt de limiettest uitgevoerd met 50% afvalwater op voorwaarde dat de conductiviteit in deze omstandigheden wel beneden 22 mS/cm ligt.**

}

6.3 METEN

pH, zuurstof, conductiviteit, temperatuur.

6.4 TESTUITVOERING

Blootstellingscondities:

- 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 vanaf 24h voor de test en tijdens de test.
- **In de test wordt tenminste 1 liter testoplossing per 1g vis voorzien.**

Testuitvoering:

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

Algemeen

- De pH, conductiviteit, temperatuur en zuurstofconcentratie in de controle- en testoplossing(en) meten en noteren **bij het begin van de test.**
- **Zet het nodige aantal** aquaria klaar en nummer.
- Vul ieder aquarium met **de gepaste hoeveelheid** oplossing (zelfde volumes voor alle aquaria die binnen dezelfde test gebruikt worden).
- Plaats in elk aquarium **het gewenste aantal** vissen van een goedgekeurde partij. }
- Noteer startdatum en -uur: de nummers van de aquaria, de inhoud, het aantal liters, aantal vissen per recipiënt en eventuele opmerkingen.
- De vissen worden na de eerste 2 à 4 uur en tenminste om de 24 uur gecontroleerd op sterfte.
- Dode vissen worden, zodra ze zijn opgemerkt, verwijderd en de sterfte wordt genoteerd (**minstens dagelijks**). Zichtbare afwijkingen (evenwichtsverlies, zwemgedrag, ademhaling, pigmentatie, ...) worden ook genoteerd.
- Meet **op het einde** van de test de temperatuur, pH en zuurstofconcentratie in de aquaria en noteer de resultaten.
- Verwijder de dieren en de oplossingen op gepaste wijze.
- Deponeer gecontamineerde afwas bij toxische afwas of niet gecontamineerd materiaal als normale afwas.

LIMIETTEST op afvalwater (96 h blootstelling)

- Species: forel (*O. Mykiss*)
- In de limiettest worden 2 testcondities getest: controle en één testconcentratie
- Voor de beoordeling van afvalwaters wordt 100% afvalwater getest, maar indien de randvoorwaarden dit niet toelaten (bv. te hoge conductiviteit) wordt een 50% verdunning getest indien in deze conditie wel voldaan is aan deze randvoorwaarden.
- De blootstellingsduur is 96 uur.
- 9 dieren en een gepast volume oplossing (tenminste 1 l testmedium per g vis) worden gebruikt in elke conditie (zelfde volume in beide condities).
- geen replica's.

VERDUNNINGSREEKS –klassieke test (96 h blootstelling)

- Species: forel voor afvalwaters; forel of andere soorten voor andere toepassingen
- Verdunningen worden maximaal 6 uur voor de test bereid (zie hoger).
- De blootstellingsduur is 96 h
- 7 dieren en een gepast volume oplossing (tenminste 1 l testmedium per g vis) worden gebruikt in elke conditie (zelfde volume in elke conditie).
- geen replica's

7 KWALITEITSCONTROLE

Tijdens de test

Enkel goedgekeurde vissen mogen gebruikt worden 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 controlegroep 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

LIMIETTEST

% sterfte na 24, 48 en 72 h wordt gerapporteerd.

VERDUNNINGSREEKS

- % sterfte na 24, 48 en 72 h wordt gerapporteerd.
- Een grafiek met het cumulatieve percentage sterfte in functie van de concentratie voor 96 uur blootstelling wordt opgesteld.
- De LC₅₀-waarde na 96 uur wordt berekend via een gepaste statistische methode.

- {} 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 slechts 0 en 100 % immobilisatie geven, dan zijn deze waarden voldoende om aan te geven in welk gebied de LC₅₀ ligt.

{}
 {}

- 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 relevant worden in het testrapport gerapporteerd:

- samenvatting van de resultaten
- gegevens over het testorganisme (wetenschappelijke naam, leverancier, batch, behandeling...)
- beschrijving van de testcondities
- gebruikte testconcentraties
- alle beschikbare gegevens over de stabiliteit van de teststof
- in geval van chemische analyses: toegepaste methoden en resultaten
- herkomst van het verdunningswater en gemeten fysicochemische 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, ...)
- vermelding of aan de kwaliteitscriteria is voldaan

{}
 {}

- meetgegevens van het zuurstofgehalte, de pH-waarde en de temperatuur van de testoplossingen voor begin en einde van de test.

VOOR VERDUNNINGSREEKSEN

{}
 {}

- cumulatieve mortaliteit in de verschillende concentraties en groepen op de aanbevolen waarnemingstijden
- grafiek van de concentratie/responspercentage-curve
- de LC₅₀-waarde voor 96 h blootstelling (met zo mogelijk de 95% betrouwbaarheidsintervallen).
- effect in de hoogste testconcentratie {}
- statistische procedures voor de bepaling van de LC₅₀-waarde

VOOR LIMIETTESTEN

- % effect in de geteste concentratie na 72h.
- Voor de beoordeling van afvalwaters is 100% de hoogste testconcentratie. Het afvalwater wordt als acuut toxisch beoordeeld indien het effect na 72h > 50% is in deze testconcentratie.
- Indien de conductiviteit van het afvalwater te hoog is, wordt de limiettest uitgevoerd op 50% afvalwater. In dat geval wordt het afvalwater als acuut toxisch beoordeeld indien het effect na 72 h > 25%.
- Indien het zoutgehalte in 50% afvalwater te hoog is wordt de acute toxiciteitstest uitgevoerd op een zoutwatervis (bv. tarbot).

De finale beoordeling van de toxicologische kwaliteit van een afvalwater is gebaseerd op het resultaat van de gevoeligste van de 4 biotesten (microtox (% inhibitie van bioluminescentie na 30 min blootstelling aan 100% afvalwater), algen (% inhibitie van de groeisnelheid na 72 uur blootstelling aan >95% afvalwater), daphnia (% immobiliteit na 48 uur blootstelling aan 100%

afvalwater) en forel (% sterfte na 96 uur blootstelling aan 100% afvalwater). Het resultaat van de meest gevoelige test wordt gebruikt om de acute toxiciteit van het afvalwater te beoordelen.

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*).