

## **Ecotoxiciteitstest: overlevingstest op vissen**

## INHOUD

<b>1</b>	<b>TOEPASSINGSGEBIED</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>PRINCIPE VAN BEIDE VISTESTEN</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>DEFINITIES</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>APPARATUUR EN MATERIAAL</b>	<b>5</b>
4.1	<i>Apparatuur en materiaal voor de juveniele vistest</i>	5
4.1.1	Apparatuur	5
4.1.2	Infrastructuur	6
4.1.3	Materiaal	6
4.1.4	Testorganismen	6
4.2	<i>Apparatuur en materiaal voor de zebravis embryo test</i>	7
4.2.1	Apparatuur	7
4.2.2	Infrastructuur	7
4.2.3	Materiaal	7
4.2.4	Testorganismen	7
<b>5</b>	<b>REAGENTIA EN OPLOSSINGEN</b>	<b>8</b>
5.1	<i>Reagentia en oplossingen voor de juveniele vistest</i>	8
5.1.1	Verdunningswater	8
5.1.2	Referentiestof	8
5.1.3	Oplossingen	8
5.2	<i>Reagentia en oplossingen voor de zebravis embryotest</i>	9
5.2.1	Verdunningswater	9
5.2.2	Referentiestof	9
5.2.3	Oplossingen	9
<b>6</b>	<b>PROCEDURE</b>	<b>10</b>
6.1	<i>Procedure voor de juveniele vistest</i>	10
6.1.1	Voorafgaande acties	10
6.1.2	Monstervoorbereiding en metingen randvoorwaarden	11
6.1.3	Testuitvoering	11
6.2	<i>Procedure voor de zebravis embryo test</i>	12
6.2.1	Voorafgaande acties	12
6.2.2	Monstervoorbereiding en metingen randvoorwaarden	13
6.2.3	Testuitvoering	13
<b>7</b>	<b>KWALITEITSCONTROLE</b>	<b>15</b>
7.1	<i>Kwaliteitscontrole in de juveniele vistest</i>	15
7.1.1	Tijdens de test	15
7.1.2	Eerstelijnscontrole	16
7.2	<i>Kwaliteitscontrole in de zebravis embryotest</i>	16
7.2.1	Tijdens de test	16
7.2.2	Eerstelijnscontrole	16

<b>8</b>	<b>BEREKENING &amp; RAPPORTERING</b>	<b>17</b>
8.1	<i>Berekening juveniele vistest</i>	17
8.1.1	Limiettesten	17
8.1.2	Verdunningsreeks	17
8.2	<i>Rapportering juveniele vistest</i>	17
8.2.1	Algemene rapportage	17
8.2.2	Limiettesten	17
8.2.3	Verdunningsreeks	18
8.3	<i>Berekening zebravis embryo test</i>	18
8.3.1	Limiettesten	18
8.3.2	Verdunningsreeks	18
8.4	<i>Rapportering zebravis embryotest</i>	18
8.4.1	Algemene rapportage	18
8.4.2	Limiettesten	19
8.4.3	Verdunningsreeks	19
<b>9</b>	<b>REFERENTIES</b>	<b>19</b>
<b>BIJLAGE A : Voorstel van werkwijze voor het opzetten van broedkoppels van zebravis voor de productie van eitjes.</b>		<b>20</b>
A.1	<i>Broedvissen, Danio rerio</i>	20
A.2	<i>Opzetten van kweekbakjes</i>	20
A.3	<i>Vorbereidingen voor het verzamelen van de eitjes 's morgens bij eileg</i>	20
A.4	<i>Verzamelen van de eitjes</i>	21
<b>BIJLAGE B : bereiding van de stockoplossing en testoplossing van referentiestof 3,4-dichloroaniline.</b>		<b>22</b>
<b>BIJLAGE C : Fotomateriaal ter illustratie van ontwikkelingsfase en effecten op zebraviseitjes &amp; -larven.</b>		<b>23</b>
C.1	<i>Evaluatie van eitjes op dag 0</i>	23
C.2	<i>Evaluatie van synchrone ontwikkelingsstadia in 1<sup>ste</sup> uren na bevruchting</i>	24
C.3	<i>Evaluatie van 4 eindpunten voor acute toxiciteit op dag 4</i>	25

## 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,...

{}

Voor de test 'acute toxiciteit voor vissen' zijn er in het kader van de WAC methode momenteel 2 testen beschikbaar, nl.

- a) Klassiek protocol met juveniele forellen, *Oncorhynchus mykiss* zoals beschreven in OECD 203 (1992) of ISO 7346-1 (1996).
- b) Alternatieve test met vroege levenstadia (ei-larve fase) van zebravis, *Danio rerio* zoals beschreven in OECD 236 (2013) of ISO 15088 (2007).

Vanwege de wetgeving op proefdierexperimenten (Richtlijn 2010/63/EU en Uitvoeringsbesluit 2012/707/EU) moet steeds waar mogelijk de alternatieve test met zebravisembryo's uitgevoerd worden. Enkel in uitzonderlijke gevallen, zoals hierna vermeld voor afvalwaters met hoge conductiviteit en mits goedkeuring van het dossier bij de ethische commissie, kunnen acute testen met juveniele forel aangewend worden.

De acute test op vissen wordt gebruikt om de toxiciteit voor het trofische niveau van de primaire of secundaire consumenten, zoals vissen te meten.

Afvalwaters met een hoog zoutgehalte of conductiviteit ( $\geq 14000 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) kunnen bij uitzondering voor de afvalwaterbeoordeling getest worden in de acute toxiciteitstest met juveniele regenboogforellen die een hoger zoutgehalte en conductiviteit verdragen (tot  $22000 \mu\text{S}/\text{cm}$ , eventueel na 1:2 of 1:4 verdunning van zout afvalwater). De acute test met forel heeft dan tot doel de aanwezigheid van schadelijke stoffen - die door zouten gemaskeerd kunnen zijn - te detecteren. De procedure wordt hieronder beschreven.

De testen kunnen 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, of bij verdunning indien de conductiviteitsrandvoorwaarde overschreden is.

## 2 PRINCIPE VAN BEIDE VISTESTEN

De acute toxiciteitstest op juveniele vissen berust op het meten van de sterfte van vissen, als maat voor acute toxiciteit na blootstelling aan (een verdunningsreeks van) een waterige oplossing of monster met een dagelijkse evaluatie gedurende 4 dagen blootstelling (96 u).

In de test met zebravisembryo worden 4 eindpunten gemeten (coagulatie ei/sterfte larve; ontbreken somietontwikkeling, ontbreken hartslag & ontbreken staartloslating), als maat voor acute toxiciteit na blootstelling aan (een verdunningsreeks van) een waterige oplossing of monster gedurende 4 dagen blootstelling. Voor zebravisembryo's blootgesteld aan afvalwaters is het voldoende om enkel op dag 4 (na 96 u blootstelling) de evaluaties te doen.

Voor de beoordeling van de toxiciteit van afvalwaters wordt een limiettest op 100% afvalwater uitgevoerd of bij overschrijding van randvoorwaarden een limiettest op verdund afvalwater, en worden de effecten na 4 dagen (96 u) blootstelling gerapporteerd.

Voor het kwantificeren van toxiciteit en relatieve toxiciteitswijzigingen kunnen testen met verdunningsreeksen worden uitgevoerd die toelaten om de gewenste effectwaarden (ECx) te bepalen. Hiervoor wordt voor afvalwaters een ½ verdunningsreeks getest (100-50-25-12.5-6.25 %). Bij hoge toxiciteit kunnen verdere verdunningen worden getest.

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

- % effect in de limiettest na 4 dagen of 96 u;
- effectwaarden voor sterfte van juveniele vissen (dagelijkse observaties iedere 24 u en/of na 4 dagen) of voor de 4 eindpunten bij zebravisembryo's (dagelijkse observaties iedere 24 u en/of na 4 dagen) indien een verdunningsreeks wordt getest: LC<sub>50</sub> /EC<sub>50</sub>, de laagste concentratie die 100% effect veroorzaakt, en het % effect dat in de hoogste concentratie wordt waargenomen.

Beide vistesten, in geval van opzetten van verdunningsreeksen kunnen eventueel 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 DEFINITIES

Volgende definities zijn van toepassing:

- *Letaliteit*: een vis of larve wordt als dood beschouwd indien geen actief zwemgedrag, of aanraking van de staartwortel geen reactie teweeg brengt en er geen ademhalingsbewegingen zichtbaar zijn.
- *LC<sub>50</sub>* (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 controle (negatieve, eventueel positieve) en 1 testconcentratie van een stof of milieumonster gebruikt.

## 4 APPARATUUR EN MATERIAAL

### 4.1 APPARATUUR EN MATERIAAL VOOR DE JUVENIELE VISTEST

#### 4.1.1 APPARATUUR

Gangbare laboratoriumapparatuur

- Zuurstofmeter.
- Thermometer.

- pH-meter.
- Conductiviteitsmeter (en/of saliniteit)
- Uitrusting voor de bepaling van de hardheid, ammoniumgehalte en chloridegehalte van het water.
- Weegschaal
- Beluchtingssysteem

#### 4.1.2 INFRASTRUCTUUR

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

#### 4.1.3 MATERIAAL

**Standaard labomateriaal om testoplossingen te bereiden.**

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

#### 4.1.4 TESTORGANISMEN

*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 5 dagen**. De sterfte van de vissen wordt dagelijks genoteerd gedurende deze periode. Na de **5 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<sup>de</sup> quarantaineperiode **van 5 à 7 dagen**. Wanneer tijdens deze 2<sup>de</sup> 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 van testorganismen {}.

Aanbevolen soort	Lengte klasse (cm)	Temper. range (°C)	Lichtperiode (uur)	Voedseltype
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regenboogforel (Teleostei, Salmonidae)	5.0 ± 2.0	13-17	12-16	forel korrel

## 4.2 APPARATUUR EN MATERIAAL VOOR DE ZEBRAVIS EMBRYO TEST

### 4.2.1 APPARATUUR

#### Gangbare laboratoriumapparatuur

- Zuurstofmeter.
- Thermometer.
- pH-meter.
- Conductiviteitsmeter (en/of saliniteit)
- Uitrusting voor de bepaling van de hardheid, ammoniumgehalte en chloride gehalte van het water.
- Weegschaal
- Beluchtingssysteem

#### Specifieke apparatuur nodig voor de embryo test

- Stereomicroscop
- Omgekeerde lichtmicroscop (tot 80x)

### 4.2.2 INFRASTRUCTUUR

Lokaal met regelbaar dag/nacht ritme en regelbare temperatuur of incubator met regelbaar dag/nacht ritme en regelbare temperatuur.

### 4.2.3 MATERIAAL

- Kweekbakjes voor broedkoppels
- Inox zeef met een maasgrootte (bv 300  $\mu\text{m}$ ) waar eitjes niet door vallen
- Oplossing methyleenblauw (stockoplossing methyleenblauw 2 % en werkoplossing 0.0002 %),
- Petriplaten ( $\Phi$  15 cm) in polystyreen
- 6-well platen (polystyreen)
- 24-well platen (polystyreen)
- Luchtdoorlatende folie om well platen af te dekken
- Standaard labomateriaal om testoplossingen te bereiden
- Pipetten met brede opening voor transfer van eitjes
- Kweekopstelling voor levende Artemia (eventueel)

### 4.2.4 TESTORGANISMEN

Voor de embryotest wordt zebravis, *Danio rerio* (wild-type) gebruikt.

Om op regelmatige tijdstippen in eitjes te voorzien is het aangewezen om een stock van broedkoppels van geslachtsrijpe zebravissen (leeftijd  $\geq$  3 mnd - max. 24 mnd) in het labo te houden. De vissen worden aangekocht bij een erkende proefdierfaciliteit en worden in het labo onder optimale condities gehouden in goede gezondheid. Broedkoppels gebruikt voor eiproductie mogen voorgaande 2 maanden niet behandeld zijn voor ziektes. De broedvissen worden op water van goede kwaliteit gehouden (zie bijlage B in OECD 236), aan een dichtheid van maximaal 1 vis per liter water bij een constante fotoperiode (12-16 u licht) en temperatuur. Parameters voor waterkwaliteit en conditie van de vissen worden op regelmatige tijdstippen geregistreerd.

Een werkwijze voor het opzetten van broedkoppels van zebravis om eitjes van goede kwaliteit te bekomen wordt beschreven in bijlage A.

Tabel 2: Aanbevelingen voor onderhoud van broedkoppels zebravis

Aanbevolen soort	Temper. range (°C)	Lichtperiode (uur)	Voedseltype
<i>Zebravis, Danio rerio</i> (Teleostei)	24-28	12-16	Droog voeder, afgewisseld met levend voer (watervlo, pekelkreeftje)

Het alternatief is om vis eitjes van goede kwaliteit aan te kopen bij een erkende proefdierfaciliteit, en beschikbaarheid zodanig in te plannen dat de start van de blootstelling van de eitjes kan plaatsvinden binnen 2 u na bevruchting.

In het rapport wordt de herkomst van testorganismen, hetzij de broedvissen, hetzij de vis eitjes steeds beschreven.

## 5 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

### 5.1 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN VOOR DE JUVENIELE VISTEST

#### 5.1.1 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 CaCO<sub>3</sub>).

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 verdunningswater.

#### 5.1.2 REFERENTESTOF

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.

#### 5.1.3 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 LC<sub>50</sub> 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:

Voor bewaring en bewaringstermijn wordt gerefereerd naar WAC/I/A/010.

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% of 25% afvalwater uitgevoerd tenzij ook dan de conductiviteit nog te hoog is.

Indien een EC<sub>50</sub> waarde bepaald moet 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, **maar in de vistest met forel kan vanwege ethische redenen het aantal verdunningen beperkt worden**. Indien de resultaten van de verdunningsreeks toelaten om een EC<sub>50</sub> 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 vervolgstap 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 EC<sub>50</sub>-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 § 6.1.2).

## 5.2 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN VOOR DE ZEBRAVIS EMBRYOTEST

### 5.2.1 VERDUNNINGSWATER

Voor blootstelling van de eitjes wordt als negatieve controle en als verdunningswater een synthetisch bereid water gebruikt. Het synthetisch medium zoals beschreven in OECD 203 of ISO 15088 wordt aanbevolen.

Voor het verdunningswater ligt de pH tussen 6.5 en 8.5, is de totale hardheid tussen 10 en 300 mg/l (uitgedrukt als CaCO<sub>3</sub>), zuurstof > 80% verzadiging en temperatuur 26 ± 1°C.

### 5.2.2 REFERENTIESTOF

De referentiestof of positieve controle is 3,4-dichloroaniline. Instructies voor bereiding van de stockoplossing zijn te vinden in Bijlage B.

### 5.2.3 OPLOSSINGEN

De verdunningen worden vers bereid, maximaal 2 uur voor het opstarten van de blootstelling in de zebra-vis embryotest.

Voor zuivere stoffen (of ook bijvoorbeeld de referentiestof of positieve controle):

- Er wordt een stockoplossing met de gewenste concentratie aangemaakt door de te testen stof op te lossen of te mengen in ultra puur water.
- De gekozen testconcentratie(s) worden bereid door de stockoplossing te verdunnen (diluties) met verdunningsmedium dat voldoet aan de eerder beschreven kwaliteitsparameters (pH, O<sub>2</sub>, hardheid, temperatuur).
- Voor verdunningsreeksen: de concentraties voor de preliminaire test zijn meestal log 10 verdunningen met een maximale concentratie van 100 mg/l of de maximaal wateroplosbare concentratie. In de finale test wordt meestal een verdunningsfactor 2 gebruikt. De concentratiereeks voor de finale test wordt gekozen op basis van de resultaten van de preliminaire test zodat (bij voorkeur) na 96 u blootstelling acute toxische effecten in de range van 0 % in de laagste tot 100 % in de hoogste testconcentratie voorkomt. Via een reeks

tussenliggende concentraties (bij voorkeur minstens 3) kan de LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>-waarde vanuit de concentratie-response curve voldoende nauwkeurig berekend worden.

- Naast de verdunningsreeks van een zuivere stof wordt een controleconditie (= verdunningsmedium zonder teststof = negatieve controle) meegenomen in de test.
- In geval een stof slecht oplost in water kan er gekozen worden voor het gebruik van een solvent. De finale solventconcentratie in de test is bij voorkeur beperkt tot 100 µl/L of een concentratie waarvan aangetoond wordt dat die biocompatibel is en niet interfereert met het eindpunt, hetgeen kan afgeleid worden via opzetten van een solvent controleconditie.

Voor afvalwaters of andere waterige milieumonsters (zie WAC/I/A/010 voor bewaring en houdbaarheid afvalwaters):

- Voor de beoordeling van afvalwater wordt enkel een limiettest uitgevoerd met 100% afvalwater, in vergelijking met verdunningsmedium, tenzij de conductiviteit te hoog is.
- In het geval dat de randvoorwaarde voor conductiviteit overschreden is, wordt een limiettest op 50% afvalwater uitgevoerd.
- In geval de conductiviteit nog te hoog is kan de optie zijn om terug te grijpen naar het opzetten van de acute mortaliteitstest met de juveniele vis, *Oncorhynchus mykiss* die goed gedijt bij hogere zout-en conductiviteitswaarden.
- Indien een LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> waarde bepaald moeten worden, wordt een verdunningsreeks van het milieumonster aangemaakt in vergelijking met het verdunningswater (negatieve controle). 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 EC<sub>50</sub> 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 100% effect in de hoogste testconcentratie opleveren. Via een reeks tussenliggende concentraties (bij voorkeur minstens 3) kan de LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>-waarde na 96 uur berekend worden.

Voor extracten van opgeconcentreerde milieumonsters:

- Indien een extractieprocedure op het oorspronkelijke staal wordt uitgevoerd, wordt verdunningsmedium op identieke wijze behandeld en wordt dit behandelde verdunningsmedium als methode-controle meegetest om de eventueel door de behandeling geïntroduceerde toxiciteit te meten.
- Bij het testen van extracten in solvent (bij voorkeur DMSO) wordt eerst de verdunningsreeks in solvent aangemaakt en daarna worden deze verdunningen aan max. 0.1% solvent getest.

## 6 PROCEDURE

### 6.1 PROCEDURE VOOR DE JUVENIELE VISTEST

#### 6.1.1 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 partij vissen (of batch)** die je voor een test gaat gebruiken. **Indien vissen van een zelfde batch later gebruikt worden voor een test moet gemiddeld gewicht minstens om de 4 weken gecontroleerd worden.**
- 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.

### 6.1.2 MONSTERVEROEBEREIDING EN METINGEN RANDVOORWAARDEN

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.

Tabel 3: Randvoorwaarden voor forel: ranges van fysico-chemische waarden op basis van geen te verwachten effecten.

Testorganisme	pH	Zuurstof (mg/l)	Geleidbaarheid (µS/cm)	Chloride (mg/l)	Ammonium (mg/l)
Forel, <i>Oncorhynchus mykiss</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% of 25 % afvalwater op voorwaarde dat de conductiviteit in deze omstandigheden wel beneden 22000 µS/cm ligt.
- **Resultaten van metingen randvoorwaarden, en eventuele aanpassingen worden in het test rapport beschreven.**

### 6.1.3 TESTUITVOERING

#### 6.1.3.1 ALGEMEEN PRINCIPE VAN UITVOERING

##### Blootstellingscondities:

- De testaquaria worden tijdens de test continu belucht met perslucht en losjes afgesloten met een 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 {}, 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. **De statische of semi-statische setup wordt in het testrapport duidelijk beschreven.**

- 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.

#### 6.1.3.2 LIMIETTEST OP AFVALWATER (96 U 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.

#### 6.1.3.3 VERDUNNINGSREEKS –KLASSIEKE TEST (96 U BLOOTSTELLING)

- Species: forel voor afvalwaters; forel of andere soorten voor andere toepassingen
- Verdunningen worden **maximaal 2 uur voor de test bereid** (zie hoger).
- De blootstellingsduur is 96 u
- 7 dieren en een gepast volume oplossing (tenminste 1 l testmedium per g vis) worden gebruikt in elke verdunningsconditie (zelfde volume in elke conditie).
- geen replica's

## 6.2 PROCEDURE VOOR DE ZEBRAVIS EMBRYOTEST

### 6.2.1 VOORAFGAANDE ACTIES

- Een stock van gezonde broedkoppels van zebravis is beschikbaar in het labo en aangepast aan de omgevingscondities. De vissen zitten minstens enkele weken gescheiden per geslacht voordat eiproduktie gewenst is. De dag voor start van blootstelling wordt ingepland om broedkoppels op te zetten.

- De volgende gegevens moeten op de laboformulieren vermeld worden: studienummer, referentienummer van het monster, speciesinformatie (+ batchnummer & oorsprong), aantal organismen per concentratie, hoeveelheid testoplossing per organisme, tijdsduur van de test, type van medium, lichtcyclus en vooropgestelde temperatuur.

### 6.2.2 MONSTERVEROEBEREIDING EN METINGEN RANDVOORWAARDEN

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.

Tabel 4: Randvoorwaarden voor zebravisembryo: ranges van fysico-chemische waarden op basis van geen te verwachten effecten.

Testorganisme	pH	Zuurstof (mg/l)	Geleidbaarheid ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Chloride (mg/l)	Ammonium (mg/l)
Zebravis, <i>Danio rerio</i>	6.5 – 9.0	> 5	< 7000	< 2000	< 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 7000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  ligt.
- Resultaten van metingen randvoorwaarden, en eventuele aanpassingen worden in het test rapport beschreven

### 6.2.3 TESTUITVOERING

#### 6.2.3.1 ALGEMEEN PRINCIPE VAN UITVOERING

##### Evaluatie en selectie van vis eitjes 's morgens na afleggen:

- Broedkoppels worden opgezet volgens de procedure beschreven in Bijlage A, op de dag voor start van blootstelling van de eitjes. Het aantal op te zetten kweekbakjes wordt berekend ifv het aantal testcondities, waarbij ruim geschat 20 eitjes per conditie moeten voorzien worden om vervolgens 12 bevruchte eitjes van goede kwaliteit te weerhouden voor de test.
- Na het verzamelen en spoelen van de eitjes wordt eerst een snelle evaluatie uitgevoerd om zeker te zijn dat
  - de geproduceerde batch eitjes van goede kwaliteit is en dat het merendeel van de eitjes bevrucht is. Niet bevruchte eitjes zijn niet transparant met wit, melkachtig uitzicht (zie ook afbeeldingen in Bijlage C). Om de batch eitjes te accepteren voor een test moet de bevruchting minstens 70% zijn per kweekbakje.
  - de verzamelde eitjes in vergelijkbare eerste ontwikkelingsstadia verkeren, namelijk 2- tot 4-cellig stadium en dus ongeveer een synchroon verloop van ontwikkeling kennen (zie afbeeldingen in Bijlage C). Occasioneel (indien grote kweekbakken, als mannetjes & vrouwtjes overnacht samen zitten) kan er toch eileg en bevruchting voorkomen vóór het licht aangaat. Meestal zijn deze eitjes te ver gevorderd in hun ontwikkeling en kunnen ze niet gebruikt worden voor een test.

Na de eerste evaluatie en goedkeuren van de batch eitjes kan de blootstelling aan testcondities starten. De eitjes van verschillende kweekbakjes worden gepoold in grote petriplaten, om hieruit een random selectie te doen voor de blootstelling.

Testuitvoering: transfer van eitjes naar testoplossingen, blootstellingscondities en evaluatie op 96 u.

- De blootstelling van eitjes aan testcondities moet zo snel mogelijk gebeuren en bij voorkeur volledig afgerond zijn binnen 2 uur na bevruchting. Men noteert het tijdstip van start van de blootstelling.
- In de 1<sup>ste</sup> fase worden de eitjes per conditie in een well van een 6-well plaat gebracht met een pipet met brede punt. In de 6-well plaat werd vooraf 8 ml/well van de testoplossing, positieve controle of viswater gepipetteerd.
- In elke well worden, at random, per testconditie minimum 15 (tot 20) embryo's geplaatst. Normaal gezien worden er geen replica wells per testconditie voorzien.
- De 6-well platen worden afgedekt met luchtdoorlaatbare folie en op temperatuur gezet ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) in een licht-donker gecontroleerde en gethermostatiseerde ruimte.
- De pH, conductiviteit, temperatuur en zuurstofconcentratie in de controle- en testoplossing(en) worden gemeten en genoteerd bij het begin van de test.
- De temperatuur in de wellplaten moet gedurende de test steeds  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  zijn. Hetzij via regelmatige metingen in één van de wells, hetzij via een logger in de incubator wordt de temperatuur tijdens de test gevolgd en geregistreerd.
- Er worden 24-well platen gereed gemaakt, en per testconditie worden 12 wells/plaat gevuld met elk 2 ml van testoplossing, afgedekt met folie en vervolgens op temperatuur geplaatst.
- In de namiddag in 2<sup>de</sup> fase, ~6 à 7 u na bevruchting controleert men de eitjes in de 6-well platen als extra controle voor succesvolle bevruchting en/of eventueel acute sterfte bij hoge concentraties teststof of milieustaal is opgetreden. Het aantal niet-bevruchte/dode eitjes wordt genoteerd.
- Vanuit elke well worden enkel bevruchte embryo's individueel overgezet naar een well op de 24-well plaat. Men zorgt ervoor om zo weinig mogelijk extra testvolume mee te pipetteren. Na vullen wordt de 24-well plaat afgedekt met folie en in de gethermostatiseerde ruimte geplaatst.
- In deze WAC procedure is enkel een evaluatie op 96 u blootstelling voorzien, maar tussentijdse evaluaties iedere 24 u zijn steeds mogelijk.
- Voor beoordeling van acute toxiciteit worden 4 biologische eindpunten geëvalueerd (zie illustraties in Bijlage C). Indien minstens één van deze 4 eindpunten voor een embryo positief scoort dan wordt dit als lethaal beschouwd.

Eindpunt	96 u
Coagulatie/sterfte van ei/larve	x
Ontbreken van somiet vorming	x
Niet loslaten staart	x
Ontbreken van hartslag	x

- *Coagulatie van ei*: dode zebraviseitjes worden herkend door hun melkachtig (niet-transparant) en later donker uitzicht, een gevolg van neerslag van eiwitten en goed zichtbaar bij microscopische evaluatie.
- *Ontbreken van somieten*: er worden 20 somieten gevormd, belangrijk voor spontane contracties in een normaal ontwikkeld embryo vanaf 24 u, maar zeker goed zichtbaar op 48 u en later. Ontbreken of onvolledige vorming van somieten kan duiden op een vertraagde ontwikkeling of volledige morfologische afwijking, en wordt gebruikt als eindpunt voor acute toxiciteit.

- *Niet-staartloslating*: bij een normale ontwikkeling zal de staart loskomen van de dooierzak bij groei van het embryo, en dit is zichtbaar vanaf 24u ontwikkeling en kan dagelijks gescoord worden. Het ontbreken van staartloslating bij zebravisembryo wordt gehanteerd als 1 van de 4 eindpunten voor acute toxiciteit.
- *Ontbreken van hartslag*: in een normaal ontwikkeld zebravisembryo gehouden bij ~26°C, is hartslag duidelijk vanaf 48 u. Het volledig ontbreken van hartslag bij evaluatie op vergroting 80X en gedurende 1 min. observatie geldt als eindpunt voor acute toxiciteit. Onregelmatige of vertraagde hartslag, of ontbreken van bloedcirculatie wordt niet gescoord als eindpunt voor acute toxiciteit.
- Naast de 4 eindpunten als indicator voor acute toxiciteit wordt eveneens gescoord of het embryo ontloken is (larve fase). Ontluiken ('hatching') van larven wordt niet gebruikt bij de berekening van effecten.
- Voor elk individu in de 24-well platen wordt gescoord en geregistreerd op formulieren, zodat % effect in de groep van 12 individuen kan berekend worden.
- De test kan vervolgens beëindigd worden: de zebravis embryo's/larven worden dood gemaakt met een hoge dosis van anaesthetica (bv. phenoxy-ethanol of MS-222) en verwijderd als biologisch afval.
- Gecontamineerde labomaterialen worden afgevoerd als toxisch afval, of gedeponneerd als gecontamineerd materiaal (glazen recipiënten) voor toxische afwas.

#### 6.2.3.2 LIMIETTEST OP AFVALWATER (96 U BLOOTSTELLING)

- Species: zebravis embryo (*Danio rerio*)
- In de limiettest worden 2 testcondities getest: negatieve controle (viswater) 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. Indien bij 50% de randvoorwaarde nog overschreden is dient men de forel test te gebruiken.
- De blootstellingsduur is 96 u
- 12 individuen worden elk in 2 ml testvolume geplaatst voor evaluatie na 96 u.

#### 6.2.3.3 VERDUNNINGSREEKS –KLASSIEKE TEST (96 U BLOOTSTELLING)

- Species: zebravis embryo (*Danio rerio*)
- Verdunningen worden 's morgens binnen 2 u voor start van blootstelling bereid
- De blootstellingsduur is 96 u
- Er worden per testconditie, 12 individuen voorzien in elk 2 ml testvolume voor evaluatie op 96 u.

## 7 KWALITEITSCONTROLE

### 7.1 KWALITEITSCONTROLE IN DE JUVENIELE VISTEST

#### 7.1.1 TIJDENS DE TEST

Enkel goedgekeurde vissen mogen gebruikt worden i.e. de sterfte na 7 dagen quarantaine < 5%. Bij sterfte tussen 5-10% kan eventueel een 2<sup>de</sup> 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.

### 7.1.2 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.

## 7.2 KWALITEITSCONTROLE IN DE ZEBRAVIS EMBRYOTEST

### 7.2.1 TIJDENS DE TEST

Een toxiciteitstest met zebravisembryo's moet aan enkele voorwaarden voldoen om als geldig beschouwd te worden:

- De test is enkel geldig indien gewerkt wordt met een batch eitjes waarvan de gemiddelde bevruchting  $\geq 70\%$  is.
- In de controlecondities (negatieve controle, solventcontrole) moet er  $\geq 80\%$  ontluiking zijn op 96 u.
- De watertemperatuur moet gedurende de test in de range  $26^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$  blijven.
- Overleving in controlecondities (negatieve controle, solventcontrole) moet steeds  $\geq 90\%$  zijn.
- Indien een positieve controle mee getest wordt (4 mg/l 3,4-dichloroaniline) dan moet er  $\geq 25\%$  acute toxiciteit zijn op 96 u.

### 7.2.2 EERSTELIJNSCONTROLE

#### Testorganismen:

- Het onderhoud van de broedkoppels die gebruikt worden voor eiproductie, wordt geregistreerd en is traceerbaar via een logboek of databank
- De productie van zebraviseitjes (globaal aantal, met aantal broedbakjes met # ♂/♀ koppels) en gemiddeld bevruchtigingspercentage wordt geregistreerd en is traceerbaar via een logboek of databank

#### Respons positieve controle:

- De (variaties in) gevoeligheid van zebravisembryo's moet gedocumenteerd worden via tenminste halfjaarlijkse testen op een verdunningsreeks van de referentiestof, 3,4-dichloroaniline waarvan de  $LC_{50}/EC_{50}$  waarden genoteerd moeten worden in een gegevensbank of via een shewart chart.
- Indien een positieve controle parallel in een test wordt opgezet (4 mg/l 3,4-dichloroaniline) dan wordt de score voor acute toxiciteit geregistreerd voor opvolging via een shewart chart. Het wordt aanbevolen om dit op regelmatige tijdstippen ifv frequentie van lopende testen in te plannen.



## 8 BEREKENING & RAPPORTERING

### 8.1 BEREKENING JUVENIELE VISTEST

#### 8.1.1 LIMIETTESTEN

% sterfte na 96 u wordt gerapporteerd voor de beoordeling van acute toxiciteit van afvalwaters. De observaties na 24, 48 en 72 u kunnen eveneens gerapporteerd worden als % effect bij de hoogst geteste concentratie.

#### 8.1.2 VERDUNNINGSREEKS

- % sterfte na 24, 48 en 72 h wordt gerapporteerd **in functie van de concentratie (verdunding afvalwater)**.
- Een grafiek met het cumulatieve percentage sterfte in functie van de concentratie voor 96 uur blootstelling wordt opgesteld.
- De LC<sub>50</sub>-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 % sterfte geven, dan zijn deze waarden voldoende om aan te geven in welk gebied de LC<sub>50</sub> 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.

### 8.2 RAPPORTERING JUVENIELE VISTEST

#### 8.2.1 ALGEMENE RAPPORTAGE

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

#### 8.2.2 LIMIETTESTEN

- % effect in de geteste concentratie **na 96 u**.
- Voor de beoordeling van afvalwaters is 100% de hoogste testconcentratie. Het afvalwater wordt als acuut toxisch beoordeeld indien het effect na **96 u  $\geq$  50%** is in deze testconcentratie.

- Indien de conductiviteit van het afvalwater te hoog is, wordt de limiettest uitgevoerd op 50% afvalwater. {}
- Indien de conductiviteit in 50% afvalwater te hoog is ( $\geq 22$  mS/cm) dan wordt de acute toxiciteitstest uitgevoerd op 25% afvalwater. {}

### 8.2.3 VERDUNNINGSREEKS

- cumulatieve mortaliteit in de verschillende concentraties en groepen op de aanbevolen waarnemingstijden
- grafiek van de concentratie/responspercentage-curve
- de LC<sub>50</sub>-waarde voor 96 u blootstelling (met zo mogelijk de 95% betrouwbaarheidsintervallen).
- effect in de hoogste testconcentratie
- statistische procedures voor de bepaling van de LC<sub>50</sub>-waarde

## 8.3 BEREKENING ZEBRAVIS EMBRYOTEST

### 8.3.1 LIMIETTESTEN

% effect (minstens 1 van de 4 eindpunten is positief gescoord, en het aantal individuen op het totaal van de testgroep wordt uitgedrukt in %) als maat voor acute toxiciteit na 96 u wordt berekend. Indien er tussentijdse observaties plaatsvonden op 24, 48 en 72 u kunnen deze eveneens worden gerapporteerd als % effect bij de hoogst geteste concentratie in vergelijking met de controle.

### 8.3.2 VERDUNNINGSREEKS

- % acuut effect wordt bepaald in functie van de concentratie (verdunding afvalwater) minstens voor tijdstip 96 u, en indien beschikbaar ook voor de tussentijdse evaluaties.
- Een grafiek met het cumulatieve percentage effect in functie van de concentratie voor 96 uur blootstelling wordt opgesteld.
- De LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> 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 % effect geven, dan zijn deze waarden voldoende om aan te geven in welk gebied de LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> 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.

## 8.4 RAPPORTERING ZEBRAVIS EMBRYOTEST

### 8.4.1 ALGEMENE RAPPORTAGE

Indien relevant worden in het testrapport gerapporteerd:

- samenvatting van de resultaten
- gegevens over het testorganisme (wetenschappelijke naam, leverancier, batch van broedkoppels, datum van eileg, bevruchtingspercentage)
- beschrijving van de testcondities
- gebruikte testconcentraties en controles (positieve, negatieve)

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

#### 8.4.2 LIMIETTESTEN

- % effect in de geteste concentratie na 96 u
- Andere observaties indien relevant.
- Voor de beoordeling van afvalwaters is 100% de hoogste testconcentratie. {}
- Indien de conductiviteit van het afvalwater te hoog is, wordt de limiettest uitgevoerd op 50% afvalwater. {}

#### 8.4.3 VERDUNNINGSREEKS

- % effect voor de verschillende concentraties op 96 u.
- Eventueel andere observaties indien relevant.
- Grafiek van de concentratie/responspercentage-curve
- De LC<sub>50</sub>-waarde voor 96 u blootstelling (met zo mogelijk de 95% betrouwbaarheidsintervallen).
- Statistische procedures voor de bepaling van de LC<sub>50</sub>-waarde

## 9 REFERENTIES

- Braunbeck T. & Lammer E. (2006). Detailed review paper "Fish embryo toxicity assay". UBA report under contract n° 20385422, German Federal Environment Agency, Berlin, 298 pp.
- ISO 7346-1 (1996). Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Part 1: Static method.
- ISO 15088 (2007). Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (Danio rerio).
- OECD guidelines for testing chemicals, N° 203 (1992) Fish acute toxicity test.
- OECD guidelines for testing chemicals, N° 236 (2013). Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.
- Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2010 betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt. Publicatieblad van de Europese Unie L 276/33. Zie <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/?uri=CELEX:32010L0063>
- Uitvoeringsbesluit 2012/707/EU van de commissie van 14 november 2012 tot vaststelling van een gemeenschappelijk format voor de indiening van de informatie overeenkomstig Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt. Publicatieblad van de Europese Unie L 320 van 17.11.2012, blz. 33. Zie [http://eur-lex.europa.eu/eli/dec\\_impl/2012/707/2014-01-15](http://eur-lex.europa.eu/eli/dec_impl/2012/707/2014-01-15)

## BIJLAGE A: VOORSTEL VAN WERKWIJZE VOOR HET OPZETTEN VAN BROEDKOPPELS VAN ZEBRAVIS VOOR DE PRODUCTIE VAN EITJES.

### A.1 Broedvissen, *Danio rerio*

Minstens 2 weken voordat men eitjes wenst te collecteren wordt een groep volwassen vissen geselecteerd uit een goedgekeurde gezonde partij vissen of ze zijn beschikbaar in het labo als broedvissen. Om maximale eileg te bekomen worden mannetjes en vrouwtjes in deze periode in aparte aquaria geplaatst. Selectie van organismen van het juiste geslacht steunt grotendeels op ervaring.

Mannetjes worden herkend aan het strepenpatroon dat meer uitgesproken is. Bij vrouwtjes valt soms de dikkere buik op door aanwezigheid van rijpe eitjes (beter zichtbaar indien enkele dagen gescheiden van mannetjes) en de kleine uitstulping ter hoogte van de genitale papil.

De broedvissen worden op water van goede kwaliteit gehouden en regelmatig gevoederd. Behalve droge pellets kan men eveneens levend voer, zoals pekelkreeftjes (*Artemia salina*) en neonaten van de watervlo (*Daphnia magna*), geven hetgeen de algemene conditie en een succesvolle reproductie ten goede komt.

### A.2 Opzetten van kweekbakjes

Daags voor eitjes nodig zijn voor een blootstelling worden volgende stappen genomen:

- Maak kleine kweekbakjes (of grote bak voor groepsbroeden) gereed en vul deze met voorverwarmd leidingwater (26 – 28°C) tot ongeveer 2 à 3 cm boven de bodem van de binnenbak. Het aantal bakken dat simultaan gebruikt wordt, is afhankelijk van het aantal eitjes dat men nodig heeft voor de geplande experimenten. Veronderstel per bakje een eiproductie van 100 tot 150 eitjes.
- Plaats mannelijke en vrouwelijke zebrevissen met een ratio van 3 tegen 2 in de kweekbakken (bij voorkeur zo laat mogelijk op de dag, bv. na 16 u).
- Verrijk de bakken met kunststof planten.
- Plaats een deksel op de bakken en minimaliseer verstoring.
- De volgende morgen zullen, door de lichtpuls (dag/nacht ritme) de vrouwtjes gestimuleerd worden om hun eitjes af te leggen waarna direct bevruchting volgt.
- Indien kweekbakjes met scheiding wordt deze voorzichtig verwijderd 10 à 15 min voordat licht aangaat.
- Vanaf een half uur nadat het licht aangaat kunnen de eitjes verzameld worden.

### A.3 Voorbereidingen voor het verzamelen van de eitjes 's morgens bij eileg

- Breng een volume viswater (26°C ± 1°C) in een glazen recipiënt zodanig dat de zeef ondergedompeld is.
- Pipetteer voor elke 100 ml viswater, 10 µl methyleenblauw (MB) van een stockoplossing (2%) in het glazen recipiënt en meng goed tot de oplossing een homogene lichtblauwe kleur heeft (= werkoplossing MB, 0.0002%)
- Vul een petrischaal half met viswater.
- Verplaats de broedvissen vanuit de kweekbakjes naar ander aquarium.
- Verwijder de binnenbak en de kunststofplanten.

**A.4 Verzamelen van de eitjes**

- Giet zeer voorzichtig en van op een zo klein mogelijke afstand de inhoud van de kweekbakjes over de zeef.
- Plaats de zeef zo snel mogelijk in de werkoplossing MB zodat de contacttijd van de eitjes met de lucht minimaal is.
- Herhaal de twee bovenstaande stappen voor elk van de bakken.
- Draai de zeef zachtjes rond in de MB werkoplossing zodat alle eitjes goed gespoeld zijn.
- Houd de zeef vertikaal boven de petrischaal en spoel voorzichtig met de spuitbus met viswater de eitjes van de mazen van de zeef in de petrischaal.
- De verzamelde eitjes zijn klaar voor evaluatie van de kwaliteit: ontwikkelingsstadium en bevrucht of dood.

Alle gebruikte materialen worden na gebruik grondig gespoeld met warm water om in de afwasmachine geplaatst te worden.

## BIJLAGE B: BEREIDING VAN DE STOCKOPLOSSING EN TESTOPLOSSING VAN REFERENTESTOF 3,4-DICHLOROANILINE.

Als positieve controle voor zebrafisei & larve-test wordt 3,4 dichloroaniline (Cas 95-76-1; MM 162.02 g/mol) gebruikt.

Er wordt een stockoplossing 100 mg/l 3,4-DCA gemaakt in verdunningsmedium van de test (bijv. viswater, OECD 203):

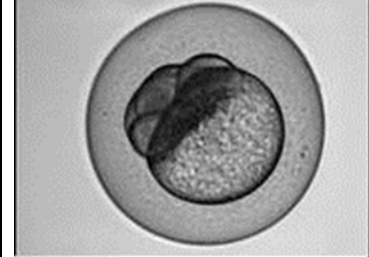
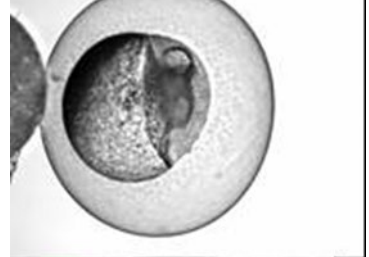
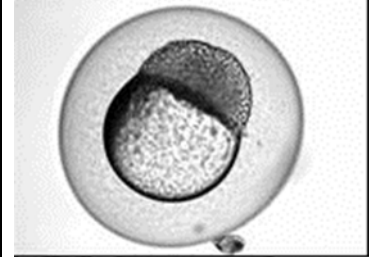
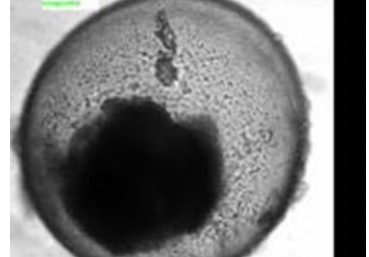
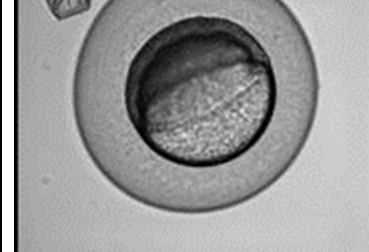
- Los 50 mg 3,4 DCA op in 500 ml verdunningsmedium
- Roer de stockoplossing gedurende 24 u bij kamertemperatuur in een afgesloten, donker recipiënt
- Meet na 24 u de pH in de stockoplossing en stel bij tot een pH-waarde  $\pm 0.5$  van die van verdunningsmedium
- De stockoplossing kan vervolgens donker, in de koelkast bewaard worden (1-8°C) gedurende max. 2 maanden
- Voor het gebruik van de stockoplossing, nodig bij het bereiden van verdunde testoplossingen, moet de stock telkens minstens 30 min. bij kamertemperatuur geroerd worden.

Voor de test kan een positieve controletestoplossing aan 4 mg/l bereid worden, en één concentratie is voldoende om in parallel met een experiment te testen. Een geldige positieve controle geeft bij 4 mg/l 3,4-DCA dan  $\geq 25\%$  acute toxiciteit.

Voor een verdunningsreeks van 3,4 DCA met minstens 5 concentraties wordt een concentratierespons curve gegenereerd die toelaat om een LC50 waarde af te leiden. De bereiding van de verdunde testoplossingen wordt geregistreerd.

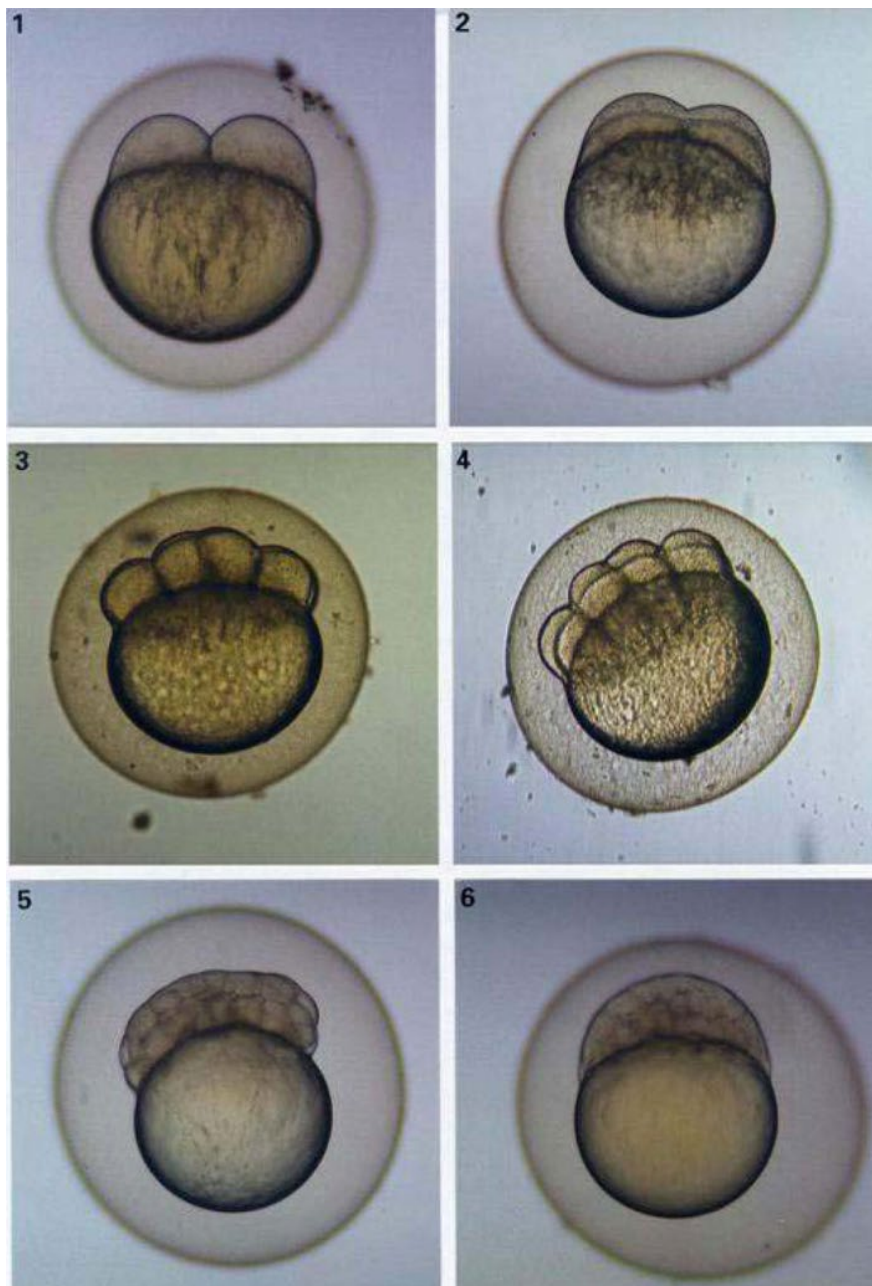
**BIJLAGE C: FOTOMATERIAAL TER ILLUSTRATIE VAN ONTWIKKELINGSFASE EN EFFECTEN OP ZEBRAVISEITJES & -LARVEN.**

**C.1 Evaluatie van eitjes op dag 0**

Goede bevruchte eitjes in ontwikkeling		Coagulatie / niet bevruchte of dode eitjes	
			
			
			

**C.2 Evaluatie van synchrone ontwikkelingsstadia in 1<sup>ste</sup> uren na bevruchting**

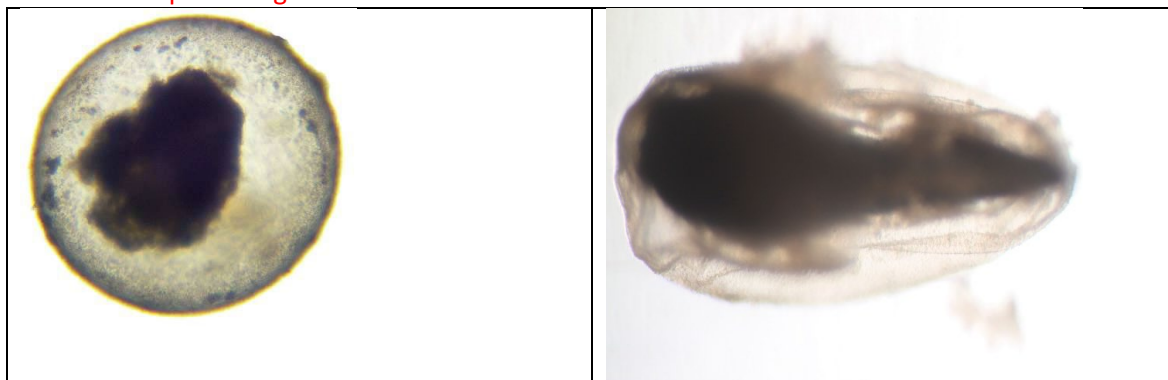
Normale ontwikkeling van zebravis embryo (*Danio rerio*): (1) 0.75 u, 2-cellig stadium; (2) 1 u, 4-cellig stadium; (3) 1.2 u, 8-cellig stadium; (4) 1.5 h, 16-cellig stadium; (5) 4.7 u, start epibolie; (6) 5.3 u, ongeveer 50 % epibolie (uit Braunbeck & Lammer 2006).





**C.3 Evaluatie van 4 eindpunten voor acute toxiciteit op dag 4**

**1. Eindpunt coagulatie zebravis ei of dode larve**



**2. Ontbreken van somieten (pijltjes)**



**3. Geen staartloslating (pijltje)**



**4. Ontbreken van hartslag (pijltje)**

