Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

http://www.emis.vito.be

# Ecotoxiciteitstest met vissen: acute toxiciteit voor zebravisembryo (Danio rerio)



emis

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

# INHOUD

**1 Toepassingsgebied** 4

**2 Keuze van testorganisme** 4

**3 Principe van de vistest** 5

*3.1 Eindpunten voor acute toxiciteit bij vissen* 5

*3.2 Limiettest* 5

*3.3 Verdunningsreeks* 5

**4 Definities** 6

**5 Acute toxiciteit voor het zebravisembryo, Danio rerio** 6

*5.1 Inleiding* 6

*5.2 Apparatuur en materiaal* 7

*5.3 Reagentia en oplossingen* 7

*5.4 Watermonster* 8

*5.5 Werkwijze* 8

5.5.1 Controle medium of verdunningswater, ook viswater 8

5.5.2 Testorganismen 9

5.5.3 Testoplossingen van het watermonster 10

5.5.4 Blootstelling van zebraviseitjes 10

5.5.6 Berekening van resultaat voor acute toxiciteit na 96 u 13

5.5.7 Kwaliteitscontrole 13

5.5.8 Rapportering 14

**6 Referenties** 15

**BIJLAGE A : Bereiding van controle- en verdunningsmedium voor zebravisembryo test.** 16

**BIJLAGE B : Bereiding van de stockoplossing en testoplossing van referentiestof 3,4-dichloroaniline.** 17

**BIJLAGE C : Voorstel van werkwijze voor het opzetten van broedkoppels van zebravis voor de productie van eitjes.** 18

*C.1 Broedvissen, Danio rerio* 18

*C.2 Opzetten van kweekbakjes* 18

*C.3 Voorbereidingen voor het verzamelen van de eitjes 's morgens bij eileg* 18

*C.4 Verzamelen van de eitjes* 19

http://www.emis.vito.be

**BIJLAGE D : Fotomateriaal ter illustratie van ontwikkelingsfase en effecten op zebraviseitjes & -larven. 20**

*D.1 Evaluatie van eitjes op dag 0 20*

*D.2 Evaluatie van synchrone ontwikkelingsstadia in 1ste uren na bevruchting 21*

*D.3 Evaluatie van 4 eindpunten voor acute toxiciteit op 96 u 22*

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

http://www.emis.vito.be

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

http://www.emis.vito.be

# 1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de werkwijze om de acute toxiciteit voor vissen met het zebravisembryo als testorganisme te bepalen. ~~en ze maakt deel uit van het erkenningspakket "W.9.2.2, acute toxiciteit voor vissen".~~ Vissen vertegenwoordigen een belangrijk trofisch niveau, als primaire of secundaire consumenten in het aquatisch ecosysteem.

De procedure is van toepassing voor

- Diverse waterige milieumatrices: afval-, oppervlakte-, drink- en grondwater.
- Waterige oplossingen met chemische stoffen, mits deze in oplossing zijn als stabiele suspensie of via dispersie.

De test 'acute toxiciteit voor vissen' wordt standaard uitgevoerd met het zebravisembryo, *Danio rerio*.

Om tegemoet te komen aan de Europese wetgeving op proefdierexperimenten (Richtlijn 2010/63/EU en Uitvoeringsbesluit 2012/707/EU), de Dierenwelzijnswet en het KB van 29 mei 2013 moet steeds waar mogelijk een alternatieve test worden uitgevoerd, om het gebruik van vissen als proefdier te beperken. Er is voor vissen de alternatieve test met zebravisembryo 's, waarbij het embryo gebruikt vóór de 5$^{de}$ dag na bevruchting of voor de leeftijd van 120 u, niet als proefdier wordt beschouwd (Uitvoeringsbesluit 2020/569/EU).

Enkel in uitzonderlijke gevallen, zoals hierna vermeld voor waters met hoge geleidbaarheid vanwege zouten, met mogelijk schadelijke effecten voor een zoetwaterorganisme (bv. toxiciteit door osmotische stress) wordt de test met zebravisembryo niet gebruikt. De acute toxiciteit door milieugevaarlijke stoffen kan beïnvloed of gemaskeerd worden door effecten van het zout. Om die reden worden er voor een testorganisme zogenaamde 'randvoorwaarden' voor de fysicochemische parameter geleidbaarheid gedefinieerd. Geleidbaarheid is een goede maat voor de totale activiteit van zoutionen, waarvan chloriden en sulfaten de belangrijkste zijn~~, gedefinieerd~~. Indien de fysicochemische parameter voor geleidbaarheid voor het zebravisembryo overschreden is, zowel bij het onverdunde watermonster (100%), alsook bij het 1:1 verdunde watermonster (50%), dan zal men voor de vistest met de juveniele regenboogforel, *Oncorhynchus mykiss* als testorganisme kiezen.
Bovendien kan de acute toxiciteit met forel enkel aangewend worden mits het labo een erkenning heeft voor het gebruik van proefdieren en een goedkeuring voor proefdierexperimenten bekomen werd bij een ethische commissie. Er wordt verwezen naar een andere WAC-procedure WAC/V/B/007: "Ecotoxiciteitstest met vissen: acute toxiciteit voor de regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*)". ~~die onder hetzelfde erkenningspakket W.9.2.2 valt.~~ Deze species heeft een bredere tolerantiegrens voor zouten.

# 2 KEUZE VAN TESTORGANISME

Voor de juiste keuze van het testorganisme is meting van geleidbaarheid~~[1]~~ in het water vereist.
Meting van de geleidbaarheid wordt getoetst aan de randvoorwaarden voor zebravisembryo (**Tabel 1**, Postma et al., 2002). Bij een overschrijding van de geleidbaarheid zowel bij het onverdunde water, als bij een 1:1 verdunning of 50% watermonster dan moet gekozen worden voor de juveniele forel als testorganisme (zie WAC/V/B/007).

~~[1] Bijkomende criteria als concentratie van chloriden en sulfaten maken deel uit van lopend onderzoek en worden momenteel nog niet gehanteerd bij keuze testorganisme.~~

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

http://www.emis.vito.be

De meetresultaten van geleidbaarheid worden gedateerd en gerapporteerd, ter motivatie voor de keuze van het testorganisme, en in geval van de zebravisembryo test eveneens ter bepaling van de hoogste testconcentratie van het water (100% of 50%).

**Tabel 1: Randvoorwaarde geleidbaarheid bij 100% of 50% water voor het zebravisembryo**

| Parameter | Geleidbaarheid (µS/cm) |
|---|---|
| Zebravisembryo, *Danio rerio* | < 7000 |

# 3 PRINCIPE VAN DE VISTEST

## 3.1 EINDPUNTEN VOOR ACUTE TOXICITEIT BIJ VISSEN

In de test met zebravisembryo worden 4 eindpunten gemeten (coagulatie ei/sterfte larve; ontbreken van normale ontwikkeling somieten, ontbreken hartslag & ontbreken staartloslating), als maat voor acute toxiciteit na blootstelling gedurende (96 ± 2) u of 4 dagen aan het watermonster in vergelijking met het controle medium. Het is voldoende om enkel op 96 u blootstelling de evaluatie van 4 eindpunten te doen. Het % effect wordt berekend door het aantal organismen in de testgroep te tellen waarvoor minstens één (of meer) van de eindpunten gescoord werd ten opzichte van het aantal gezonde organismen bij start van de test.
De acute toxiciteitstest op juveniele vissen berust op het meten van de sterfte van vissen, als maat voor acute toxiciteit na blootstelling gedurende (96 ± 2) u of 4 dagen aan het watermonster in vergelijking met het controle medium. De sterfte wordt dagelijks gecontroleerd, en het cumulatief aantal dode vissen op 96 u wordt berekend als % effect in de testgroep t.o.v. het aantal levende vissen bij aanvang van de test (zie WAC/V/B/007).

## 3.2 LIMIETTEST

Voor het meten van de toxiciteit van waters wordt standaard een limiettest uitgevoerd op onverdund water (100%), of 50% indien de randvoorwaarde voor geleidbaarheid overschreden is voor het zebravisembryo. Het % effect na 96 u blootstelling aan de hoogst geteste concentratie van het water (100% of 50%) wordt gerapporteerd, en dit telkens in vergelijking met het % effect bij blootstelling aan controle medium.

## 3.3 VERDUNNINGSREEKS

Uitzonderlijk worden de testen uitgevoerd op een verdunningsreeks van het watermonster. Dit kan van toepassing zijn wanneer dit vereist is in het kader van de bijzondere voorwaarde in een vergunning of bij verder onderzoek naar oorzaken van acute toxiciteit (TIE-Toxiciteit identificatie & evaluatie). Voor de zebravisembryo test kan ook bij het testen van een referentiestof, als deel van kwaliteitscontrole, een verdunningsreeks opgezet worden.
Het watermonster (of de referentiestof) wordt in een reeks van minstens 5 concentraties getest, bijvoorbeeld 100%, 50%, 25%, 12.5% en 6.25%, naast de controle conditie op basis van een verdunningsfactor 2, die groter kan zijn naargelang de beoogde concentratierange. De concentratiereeks van het watermonster of de referentiestof wordt zodanig gekozen dat de hoogste concentratie ongeveer 100% effect oplevert, en de laagste concentratie 0% effect (of niet significant

verschillend van de controle). Dit laat toe een grafiek met concentratie-effect voor acute toxiciteit voor zebravisembryo te genereren, alsook een $EC_{50}$-waarde te berekenen die de concentratie van het water of referentiestof geeft waarbij 50% van de testorganismen acute toxiciteit ondervinden. Bij deze test met een verdunningsreeks kan eveneens het % effect, zoals in de limiettest, bepaald worden voor het onverdunde water of de hoogste testconcentratie van de reeks.
Indien een verdunningsreeks van een watermonster moet opgezet worden met de juveniele forel, dan moet een aangepaste werkwijze gevolgd worden door trapsgewijs te testen om het gebruik van aantal proefdieren en het lijden te beperken, en mits goedkeuring van de ethische commissie (voor meer details verwijzen we naar de overeenkomstige procedure WAC/V/B/007).

# 4 DEFINITIES

Volgende definities zijn van toepassing:

- $EC_{50}$ (50 % effectconcentratie): dit is de concentratie van het water of een referentiestof waarbij 50% van de testorganismen in een testgroep een effect ondervinden na een bepaalde blootstellingsperiode. Indien het effect letaliteit (sterfte) is, dan wordt dit een $LC_{50}$.
- Letaliteit: een vis of larve wordt als dood beschouwd indien geen actief zwemgedrag, of aanraking van de staartwortel geen reactie teweegbrengt 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.
- Limiettest: in de test wordt 1 concentratie van het water (nl. de hoogste concentratie 100% of het onverdunde water) geëvalueerd in vergelijking met controle medium.
- Randvoorwaarden: voor het testmonster geldende grenzen voor fysicochemische parameters, zoals pH, $O_2$, geleidbaarheid…. waarbij er geen effect op (acute) toxiciteit wordt verwacht ten opzichte van de controle conditie.
- 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 en/of de uitvoering van de test voldoet aan vooropgestelde criteria qua te verwachten toxische effecten voor de referentiestof (ook positieve controle).
- Toxiciteit identificatie en evaluatie (TIE): onderzoek naar de oorzaken van toxiciteit door watermonsters te onderwerpen aan diverse behandelingen (filtratie, actieve kool, organische extractie.) met het doel de toxiciteit toe te wijzen aan bepaalde fracties uit deze behandelingsstappen.

# 5 ACUTE TOXICITEIT VOOR HET ZEBRAVISEMBRYO, DANIO RERIO

## 5.1 INLEIDING

De uitvoering van de acute toxiciteit met zebravisembryo voor watermonsters in deze WAC-procedure is gebaseerd op 2 internationale richtlijnen, nl. ISO 15088 (2007) en OECD 236 (2013).

Deze test wordt uitgevoerd met vroege ontwikkelingsstadia van zebravis tot de leeftijd van 4 dagen, en is niet onderworpen aan de proefdierwetgeving.

Om met deze testorganismen te werken zijn er 2 mogelijkheden:

1. Men houdt broedkoppels (volwassen mannelijke en vrouwelijke zebravissen) in het labo om op regelmatige tijdstippen in functie van de uit te voeren testen, bevruchte zebraviseitjes te



Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024
http://www.emis.vito.be
emis

verzamelen. Men dient zich hiervoor in regel te stellen met de wetgeving dierenwelzijn (zie https://dierenwelzijn.vlaanderen.be/wetgeving-dierenwelzijn).

2. Men neemt contact met een erkend proefdierlaboratorium waar men een kweek heeft van wild-type zebravissen. Mits de nodige afspraken qua timing en levering van goede kwaliteit bevruchte zebraviseitjes mogen deze extern aangekocht worden.

Meer toelichting in de sectie over testorganismen (zie 5.5.2).

### 5.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Zuurstofmeter voor bepaling conform WAC/III/A/008
- Thermometer en/of logger voor registratie van min. en max. temperatuur
- pH-meter voor pH meting conform WAC/III/A/005
- Geleidbaarheidsmeter voor meting geleidbaarheid conform WAC/III/A/004
- ~~Materiaal en apparatuur voor de bepaling van chloriden en sulfaten conform WAC procedure WAC/III/C~~
- Materiaal en apparatuur voor de bepaling van ammonium
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg
- Klimaatkamer of incubator met instelbare temperatuur en lichtcyclus
- Beluchting systeem (olie-vrij)
- Pipetten en toebehoren
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven, maatcilinders voor bereiding van testoplossingen en verdunningen.
- Recipiënten voor meting van fysicochemische parameters.
- Grote petriplaat (15 cm $\phi$) met deksel voor het verzamelen en spoelen van eitjes
- Multiwell testplaten met deksel (polystyreen): 6-well & 24-well
- Luchtdoorlatende folie om well platen af te dekken
- Glazen pasteurpipet met afgeslepen punt en opening voldoende voor transfer van zebraviseitjes
- Stereomicroscoop
- Omgekeerde lichtmicroscoop (tot 80x)
- Inox zeef met een maasgrootte (bv 300 µm) waar eitjes niet door vallen
- Kweekopstelling voor levende Artemia (eventueel) en/of ander (levend) voer voor broedkoppels
- Kweekbakjes met deksel, en met tussenschot voor broedkoppels zebravis, en materiaal (kunststofplanten) voor verrijking en beperking van stress voor mannelijke vissen

### 5.3 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Oplossing methyleenblauw (stockoplossing methyleenblauw 2 % en werkoplossing 0.0002 %),
- Gedemineraliseerd water (< 10 µS/cm).
- HCl, 0.1N en NaOH, 0.1N
- Zouten, calciumchloride, magnesiumsulfaat, natriumbicarbonaat en kaliumchloride van analytische kwaliteit (zie BIJLAGE A) voor de bereiding van controle medium en verdunningsmedium (ook viswater).
- 3,4 Dichloroaniline (DCA), analytische kwaliteit (referentiestof, zie 5.5.7, Kwaliteitscontrole). Instructies voor bereiding van de stockoplossing zijn te vinden in BIJLAGE B.
- Verdovingsmiddel voor euthanasie van embryo's.

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024
http://www.emis.vito.be
emis

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

http://www.emis.vito.be

### 5.4 WATERMONSTER

Voor de monstername en houdbaarheid wordt verwezen naar respectievelijk WAC/I/A/003, WAC/I/A/004 en WAC/I/A/010.
Bij gebruik voor fysicochemische metingen om de randvoorwaarden te controleren wordt een gehomogeniseerd en representatief deelstaal genomen van het watermonster, en op kamertemperatuur gezet.
Naast de meting van geleidbaarheid bij keuze van testorganisme (zie 2) wordt eveneens pH, zuurstof, ~~chloriden, sulfaten~~ en ammonium gemeten en gerapporteerd. Voor de meeste van deze parameters zijn er aanvaardbare ranges gedefinieerd waarbij er geen effect verschillend van controle (≤ 10 %) in de vorm van acute toxiciteit voor het embryo zou optreden (**Tabel 2**, Postma et al. 2002).

**Tabel 2: Randvoorwaarde voor fysicochemische parameters in watermonsters voor zebravisembryo.**

| Parameter | pH | Zuurstof (mg/l) | Geleidbaarheid (µS/cm) | ~~Chloriden (mg/l)~~ | ~~Sulfaten (mg/l)~~ | Ammonium (mg/l $NH4^+$bij pH8)[2] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Zebravisembryo, Danio *rerio* | 6.5 – 9.0 | ≥ 5 | < 7000 | ~~< 2000~~ | ~~g.d.~~ | < 18.0 |

g.d. geen data

Indien de pH van het watermonster buiten de toegelaten range valt (< 6.5 of > 9), dan wordt meteen de pH aangepast met zuur of base tot een pH- overeenkomstig die van het controle medium ± 0.1.
Enkel en alleen indien het zuurstofgehalte lager is dan 5.0 mg/l, dan wordt het watermonster gedurende 20 min., net voor aanvang van de test, belucht. De aanpassingen voor pH en zuurstof worden gerapporteerd.

De meting van ~~chloriden, sulfaten en~~ ammonium wordt gerapporteerd. In geval van afwijkende randvoorwaarde voor ammonium ~~en chloriden~~ wordt er niet gecorrigeerd, en wordt overschrijding van randvoorwaarde duidelijk vermeld in het rapport, als mogelijke parameter die bijdraagt tot gemeten toxiciteit, naast deze die te wijten zou zijn aan milieugevaarlijke stoffen.

In overleg met de opdrachtgever kan bij afwijking van ammonium alsnog een nieuwe test worden uitgevoerd door aanpassingen te doen aan het water (bijv. beluchten om ammonium te strippen, of bufferen voor pH om ammonium effect uit te sluiten) gevolgd door meting van ammonium. Dergelijke aanpassingen aan het watermonster moeten gerapporteerd worden als een afwijking op de methode.

### 5.5 WERKWIJZE

#### 5.5.1 CONTROLE MEDIUM OF VERDUNNINGSWATER, OOK VISWATER

Voor de zebravisembryo test wordt er met gereconstitueerd medium gewerkt, vertrekkende van 4 zouten om controle medium of verdunningswater, ook viswater genoemd, te bereiden. De samenstelling is deze zoals voorgeschreven in ISO 7346-1 (**Tabel 3**). Een werkwijze voor de bereiding van stockoplossingen (40x), en verdunning tot controle medium of viswater wordt gegeven in BIJLAGE A.

[2] Randvoorwaarde ammonium bij pH> 8 kan lager zijn vanwege hogere toxiciteit, maar data ontbreken.

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

Het controle medium of viswater wordt op kamertemperatuur gebracht en belucht voor gebruik in de testen.

**Tabel 3: Samenstelling van controle en verdunningsmedium (viswater) in de zebravisembryo test**

| Zout | Concentratie (mg/l) |
|---|---|
| $NaHCO_3$ | 63 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 294 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 123.3 |
| KCl | 5.5 |

### 5.5.2 TESTORGANISMEN

#### 5.5.2.1 HERKOMST

De acute toxiciteit voor de zebravisembryo test maakt gebruik van pas bevruchte eitjes, die verkregen worden van broedkoppels zebravis, *Danio rerio* van het wild-type. Het labo neemt de nodige maatregelen om in regel te zijn met de wetgeving dierenwelzijn.

Om op regelmatige tijdstippen in eitjes te voorzien is het aangewezen om een stock van broedkoppels van geslachtsrijpe zebravissen (leeftijd ≥ 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 (voor details zie OECD 236 richtlijn: annex 2). Ze worden aan een dichtheid van maximaal 1 vis per liter water geplaatst bij een constante fotoperiode (duur lichtperiode tussen 12 en 16 u), en watertemperatuur (26 ± 2)°C. Parameters voor waterkwaliteit en gezondheidsconditie van de vissen worden op dagelijks geregistreerd en bijgehouden in een logboek.
Een werkwijze voor het opzetten van broedkoppels van zebravis om eitjes van goede kwaliteit te bekomen wordt beschreven in BIJLAGE C.

Het alternatief is om viseitjes 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. De herkomst en gegevens van de levering moeten traceerbaar zijn.

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

#### 5.5.2.2 EVALUATIE EN SELECTIE VAN BEVRUCHTE VISEITJES ('S MORGENS NA AFLEGGEN)

- Broedkoppels worden opgezet volgens de procedure beschreven in BIJLAGE C, op de dag voor start van blootstelling van de eitjes. Het aantal op te zetten kweekbakjes wordt berekend i.f.v. 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 (zie C.4 in BIJLAGE C) 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 en hebben een wit, melkachtig uitzicht. Soms kunnen bevruchte eitjes snel afsterven, en niet verder delen en tonen ze een vlokvormige witgrijze massa door degeneratie van eiwitten (zie ook afbeeldingen D.1 in BIJLAGE D). Om de batch eitjes te accepteren voor een test moeten er minstens 70% gezonde, normaal ontwikkelde en bevruchte eitjes zijn om de test te starten.

http://www.emis.vito.be

- De verzamelde eitjes in vergelijkbare ontwikkelingsstadia verkeren, namelijk 2- tot 4-cellig stadium en dus ongeveer een synchroon verloop van ontwikkeling kennen (zie afbeeldingen D.2 in BIJLAGE D). Dit kan in de hand gewerkt worden door kweekbakjes met tussenschotten te gebruiken, waarbij pas 's morgens net voor het afleggen van de eitjes de mannetjes in contact komen met de vrouwtjes door het wegnemen van het tussenschot.

Na de eerste evaluatie en goedkeuren van de batch eitjes (criterium 70% gezonde, bevruchte 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.

### 5.5.3 TESTOPLOSSINGEN VAN HET WATERMONSTER

Het water wordt op kamertemperatuur gebracht, en goed gehomogeniseerd door schudden voor gebruik. De testoplossingen met watermonsters worden vers bereid tot maximum 4 uur voor aanvang van de test.
Van elke testoplossing wordt 100 ml gemaakt, waarvan 8 ml transferoplossing voor de 6-well plaat, 2 ml/well/organisme X 12 organismen voor de 24 well plaat. Er is dan voldoende van de testoplossing met de hoogste concentratie om ook fysicochemische metingen uit te voeren, in parallel met de controle conditie zowel bij de limiettest als bij een verdunningsreeks. Een afzonderlijk recipiënt voor de controle en hoogste testconcentratie wordt geïncubeerd tijdens de blootstelling voor de fysicochemische metingen op einde van de test.

#### 5.5.3.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

Het water wordt standaard in een limiettest geëvalueerd als onverdund water (hoogste testconcentratie of 100% water), of 1:1 verdund water (50%) bij overschrijding van geleidbaarheid voor zebravisembryo (zie **Tabel 1**), en dit in vergelijking met een controle conditie (100% verdunningswater of viswater).

#### 5.5.3.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR $EC_{50}$ BEPALING

Indien van toepassing (bijv. volgens bijzondere voorwaarde in vergunning van het bedrijf) moet het water in een verdunningsreeks getest worden om een $EC_{50}$ waarde te bepalen. Hiervoor wordt het watermonster verdund met verdunningswater (zie 5.5.1), voor minstens 5 concentraties met bijv. een verdunningsfactor 2, namelijk 100%, 50%, 25%, 12.5% en 6.25% van het water in vergelijking met controle (0% watermonster in verdunningswater).
Uitzonderlijk is een range finding test nodig, bijv. indien zeer hoge toxiciteit verwacht wordt. Hierbij wordt een verdunningsreeks opgezet met hoge verdunningsfactor, bijv. 10 om de 0-100% effectrange te vinden. Uit deze test kan de verfijnde testrange (met lagere verdunningsfactor, minimum 2) afgeleid worden met concentraties van water waarbij minstens 1 punt met 100% effect en een punt met een effect ≤ 10%, en met indien mogelijk meerdere punten op de helling van de concentratie-effect curve om een nauwkeurige $EC_{50}$ waarde te berekenen. Indien er weinig tot geen effect is (< 50% acute toxiciteit), kan er geen $EC_{50}$ waarde bepaald worden.

### 5.5.4 BLOOTSTELLING VAN ZEBRAVISEITJES

#### 5.5.4.1 BLOOTSTELLINGSCONDITIES

- Duur: (96 ± 2) u
- Licht-donker cyclus: 16 u licht/8 u donker.
- Temperatuur van testoplossingen: (26 ± 1)°C tijdens blootstelling, een temperatuur-gecontroleerde kamer of incubator te gebruiken voor de test. Via een temperatuurlogger in een

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024
http://www.emis.vito.be
emis

testbeker (10 ml test vloeistof) naast de multiwell platen wordt de temperatuur opgevolgd gedurende de blootstellingsperiode. Gedurende de test mag het temperatuurverschil niet meer dan 2°C bedragen.

- Testrecipiënt: 24-well plaat, polystyreen. De 24-well plaat wordt afgedekt met luchtdoorlaatbare folie, en het deksel.
- Test volume: 2 ml per well, 1 eitje/well.
- Replica's: 12 bevruchte eitjes per testconditie, zowel voor watermonster als voor controle medium (viswater).
- Deze condities zijn dezelfde bij de limiettest en test met verdunningsreeks.

#### 5.5.4.2 TRANSFER VAN EITJES NAAR TESTOPLOSSINGEN IN EEN 6-WELL PLAAT BINNEN 2U NA BEVRUCHTING

- De blootstelling van eitjes aan testcondities moet zo snel mogelijk gebeuren en volledig afgerond zijn binnen 2 uur na bevruchting. Men noteert het tijdstip van start van de blootstelling in de 6-well plaat op het laboformulier.
- Een 6-well plaat wordt gevuld met voor elke testconditie, 8 ml/well. Deze plaat werd in de incubator of temperatuur gecontroleerde kamer geplaatst, voor het verzamelen van de eitjes, zodat testoplossingen op 26°C komen.
- In de 1$^{ste}$ fase worden met behulp van een omgekeerde microscoop de bevruchte eitjes, zoals weerhouden bij evaluatie en selectie van het legsel (zie 5.5.2.2) per conditie in een well van een 6-well plaat gebracht met een pipet met brede punt. Men zorgt ervoor om, bij de transfer van eitjes uit de grote petriplaat met viswater, zo weinig mogelijk vloeistof met de eitjes over te brengen naar de 6-well plaat om verdunning van de testoplossing van het watermonster te vermijden.
- In elke well worden, at random, per testconditie minimum 15 (tot 20) goede eitjes geplaatst.
- De 6-well platen worden op temperatuur gezet (26°C ± 1)°C in een licht-donker gecontroleerde en gethermostatiseerde ruimte.

#### 5.5.4.3 TRANSFER VAN BEVRUCHTE EITJES NAAR 24-WELL TESTRECIPIËNT

- Er werden 24-well platen gereed gemaakt, en per testconditie werden 12 wells/plaat gevuld met elk 2 ml van testoplossing of controle medium en vervolgens op temperatuur geplaatst in de voormiddag.
- In de namiddag, in 2$^{de}$ fase ~6 à 7 u na bevruchting controleert men de eitjes in de 6-well platen als extra controle voor succesvolle bevruchting en ontwikkeling, en/of eventueel acute sterfte bij hoogste concentratie van testoplossing is opgetreden. Het aantal niet-bevruchte/dode eitjes wordt genoteerd op het totaal aantal (= indicatie van vroege toxiciteit) voor de 6-wells. In de controle conditie zou er, mits goede selectie in fase 1, geen dood of niet-bevrucht eitje mogen voorkomen.
- Vanuit elke well worden per testconditie, enkel de bevruchte eitjes en normaal ontwikkelde eitjes individueel overgezet naar een reeks van 12 wells/conditie op de 24-well plaat. Men zorgt ervoor om zo weinig mogelijk extra testvolume mee te pipetteren.
- Indien er bij blootstelling aan een testoplossing van watermonster reeds duidelijke toxiciteit is opgetreden in de 6-well, dan zal men zo goed mogelijk een representatieve selectie maken om alsnog in totaal 12 eitjes over te zetten naar de testoplossing in de 24-well plaat.
- Controleer de 24-well plaat of er in elke well één eitje x 12, per testconditie aanwezig is.
- De 24-well plaat wordt afgedekt met folie en het deksel, en in de gethermostatiseerde ruimte geplaatst bij 16 u licht/8 u donker.
- De temperatuur in de wellplaten moet gedurende de test steeds (26 ± 1)°C zijn. Men plaatst daarom naast de well platen, een kleine beker viswater, afgedekt met folie met daarin een sensor voor registratie van min. en max. temperatuur tijdens de 96 u blootstelling.

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024
http://www.emis.vito.be
emis

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

http://www.emis.vito.be

- De pH, geleidbaarheid, en zuurstofconcentratie in resterende controle en testoplossing(en) worden gemeten en genoteerd bij het begin van de test. Uitsluitend in het controle medium en in de hoogste testconcentratie, zowel voor de limiettest als van een verdunningsreeks moet er gemeten worden.
- Men plaatst van het controle medium en de hoogste concentratie van te testen watermonster (zowel bij limiettest, als verdunningsreeks) een kleine beker met testoplossing in de incubator, afgedekt met folie, naast de 24-well platen tijdens de volledige periode van blootstelling. Deze beker zal gebruikt worden voor fysicochemische metingen op einde van de test.

### 5.5.5 EVALUATIE VAN TEST OP 96 U

- De evaluatie is enkel vereist op (96 ± 2) u blootstelling vereist, en dit zowel in de limiettest als de test met verdunningsreeks.
- Voor beoordeling van acute toxiciteit worden 4 biologische eindpunten geëvalueerd die in Tabel 4 opgesomd zijn en hieronder verduidelijkt (zie ook de illustraties D.3 in BIJLAGE D). Indien minstens één van deze 4 eindpunten voor een embryo positief scoort dan wordt dit als lethaal (= effect voor acute toxiciteit zebravisembryo) beschouwd.

**Tabel 4: Eindpunten voor evaluatie zebravisembryo na (96 ± 2) u blootstelling**

| 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 zebravis eitjes 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. Het ontbreken van staartloslating bij zebravisembryo wordt gehanteerd als 1 van de 4 eindpunten voor acute toxiciteit op 96 u.
  - *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 voor andere opvallende observaties: bijv. 1) niet ontluiken ('no hatching'), hetgeen normaal zou gebeuren tussen 72 en 96 u, 2) oedeemvorming of 3) andere afwijkingen. Geen enkele van deze bijkomende observaties zal gebruikt bij de beoordeling voor acute effecten.

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

http://www.emis.vito.be

- Voor elk individu in de 24-well platen wordt gescoord en geregistreerd op formulieren, zodat % effect in de groep van 12 individuen/testconditie kan berekend worden.
- De temperatuurregistraties tijdens het verloop van de test worden nagekeken, terwijl minimum- en maximumtemperatuur voor de volledige duur van de test gerapporteerd worden.
- Fysicochemische parameters, nl. zuurstof en pH worden gemeten en geregistreerd in de afzonderlijke beker bij incubatie, en dit is enkel nodig in het controle medium en in de hoogste testconcentratie, zowel voor de limiettest als bij de test van een verdunningsreeks.
- De test wordt beëindigd: de zebravisembryo 's/larven worden dood gemaakt met een hoge dosis van een anestheticum en verwijderd als biologisch afval.

### 5.5.6 BEREKENING VAN RESULTAAT VOOR ACUTE TOXICITEIT NA 96 U

#### 5.5.6.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

De aflezing voor 4 eindpunten voor acute toxiciteit op (96 ± 2) u voor elk van de 12 organismen per testconditie resulteert in een cumulatief aantal zebravisembryo 's waarvoor minstens één van de eindpunten verstoord was, ten opzichte van het totaal goede embryo's (n=12) bij aanvang van de test. Het resultaat wordt omgerekend in % van organismen met een acuut effect voor de hoogst geteste concentratie van het watermonster (onverdund of 50%) en voor de controle conditie.

#### 5.5.6.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR $EC_{50}$ BEPALING

- Voor elke concentratie watermonster en voor de controle wordt het aantal zebravisembryo 's geteld, waarvoor er minstens één van de 4 eindpunten voor acute toxiciteit gescoord werd, en dit aantal wordt berekend ten opzichte van het aantal gezonde embryo's bij start (n=12) en uitgedrukt als % effect na 96 u blootstelling. Dit is naar analogie met de limiettest.
- De resultaten van % effect (Y-as) worden grafisch voorgesteld als functie van de concentratie (% verdunning) van het watermonster (X-as). Een betrouwbare $EC_{50}$ waarde kan enkel afgeleid worden indien een goede concentratie-effect relatie met een verloop van ongeveer 0 tot 100% effect.
- Een $EC_{50}$ waarde kan afgeleid of berekend worden op verschillende manieren (grafische interpolatie of statistische methoden, als probit analyse). Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge concentratieverhouding van 2, respectievelijk 0 en 100% effect veroorzaken, is het voldoende de $EC_{50}$ te situeren tussen deze beide concentraties.

### 5.5.7 KWALITEITSCONTROLE

#### 5.5.7.1 EERSTELIJNSCONTROLE

***Beslissingscriterium voor geldigheid van de test:***

Overleving in controle condities (viswater) moet steeds ≥90% zijn op 96 u. De scores voor de controle van elke test moet bijgehouden worden in een limietkaart.

***Herkomst en kwaliteit van testorganismen:***

- Het onderhoud van de broedkoppels die gebruikt worden voor eiproductie in het labo, wordt geregistreerd. De productie van eitjes (globaal aantal, en aantal succesvolle kweekbakjes met ratio ♂/♀), het gemiddelde bevruchtingspercentage per batch eitjes en gebruik voor testen is traceerbaar via een logboek of databank.
- Bij aankoop van eitjes extern is de herkomst, het gemiddelde bevruchtingspercentage per batch en gebruik voor testen traceerbaar via een logboek of databank.

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

#### 5.5.7.2 TWEEDELIJNSCONTROLE

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

De methode toegepast in het labo, hetzij met zebraviseitjes uit eigen productie, of met aangekochte eitjes wordt op de hieronder vermelde tijdstippen uitgevoerd met een positieve controle (3,4 dichloroaniline) waarvoor de $EC_{50}$ bepaald wordt na 96 u voor een dilutiereeks met 0 en 100% effect (testrange 1-8 mg/l DCA).

- De $EC_{50}$ wordt geregistreerd in een statistische controlekaart, en de ruwe gegevens met grafische voorstelling van concentratie-respons worden gecontroleerd voor een goede concentratie-effect relatie.
- De minimale frequentie voor een test met positieve controle is als volgt:
  - Bij wekelijkse uitvoering van de test: driemaandelijks positieve controle testen.
  - Bij maandelijkse uitvoering: zesmaandelijks een positieve controle test.
  - Bovendien zal ieder van de betrokken uitvoerders minstens 1 maal per jaar een test met een dilutiereeks van een positieve controle uitvoeren.

#### 5.5.7.3 OPVOLGING VAN AFWIJKINGEN

Indien de $EC_{50}$ resultaten van de positieve controle niet voldoen aan de vooropgestelde criteria, of afwijkende concentratie-effect curves bij een verdunningsreeks, of als de controle niet voldoet aan het criterium van ≥ 90% overleving na (96 ± 2) u, dan dient een analyse van de oorzaak en reikwijdte uitgevoerd te worden. Indien hieruit blijkt dat bepaalde resultaten onbetrouwbaar zijn mogen deze niet gerapporteerd worden en dient een nieuwe bemonstering te worden uitgevoerd van de geteste waters. Indien van toepassing dient ook de impact op eerder gerapporteerde resultaten te worden nagegaan.

### 5.5.8 RAPPORTERING

Het testrapport bevat:

- De identificatie van het watermonster, gegevens over monstername, datum van testuitvoering met monster, resultaten van meting van de randvoorwaarden en aanpassingen, indien van toepassing.
- Verwijzing naar de betreffende WAC-methode voor ecotoxiciteit, en WAC-methode voor bepaling van fysicochemische parameters.
- Gegevens over het testorganisme (naam, herkomst, batch), motivatie voor keuze van testorganisme a.d.h.v. gemeten randvoorwaarde en type test met hoogste testconcentratie (limiet, of verdunningsreeks).
- Resultaten:
  - Fysicochemische parameters van testoplossingen en controle op T = 0 en T = 96 u
  - % effect na (96 ± 2) u in controle en watermonster, met de geteste concentratie (limiettest) of
  - $EC_{50}$ voor acute effecten na (96 ± 2) u bij verdunningsreeks van het watermonster, met % effect in de hoogst geteste concentratie van het watermonster en grafiek voor concentratie-effect op 96 u.
- Opmerkingen en afwijkingen.

http://www.emis.vito.be

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

http://www.emis.vito.be

# 6 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).
- Koninklijk besluit bescherming van proefdieren, KB 29 mei 2013. Zie ook: https://dierenwelzijn.vlaanderen.be/sites/default/files/atoms/files/KB%2029.05.13%20Bescherming%20van%20proefdieren.pdf, en bijlage, zie https://dierenwelzijn.vlaanderen.be/sites/default/files/atoms/files/Bijlagen%20bij%20%20KB%2029%20mei%202013%20proefdieren_0.pdf
- OECD guidelines for testing chemicals, N° 203 (2019) 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 ook: https://dierenwelzijn.vlaanderen.be/sites/default/files/atoms/files/2010-09-22_Richtlijn_EU-2010-63_bescherming-proefdieren.pdf
- 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, Zie https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/36ef2c9c-33b4-11e2-84d0-01aa75ed71a1/language-nl
- Uitvoeringsbesluit 2020/569/EU van de commissie van 16 april 2020 tot vaststelling van een gemeenschappelijk format en gemeenschappelijke inhoud voor de indiening van de informatie die door de lidstaten moet worden gerapporteerd overeenkomstig Richtlijn 2010/63/EU van het Europees Parlement en de Raad betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt en tot intrekking van Uitvoeringsbesluit 2012/707/EU van de Commissie. Zie: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020D0569&from=nl
- WAC/V/B/007. Ecotoxiciteitstest met vissen: acute toxiciteit voor de regenboogforel *(Oncorhynchus mykiss*)

# BIJLAGE A: BEREIDING VAN CONTROLE- EN VERDUNNINGSMEDIUM VOOR ZEBRAVISEMBRYO TEST.

## A.1 Bereiding stockoplossingen

Voor de bereiding van stockoplossingen met zouten worden reagentia met gekende analytische zuiverheid gebruikt.

- Calciumchloride: los 11.76 g calciumchloride dihydraat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.
- Magnesiumsulfaat: los 4.93 g magnesiumsulfaat heptahydraat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.
- Natriumbicarbonaat: los 2.52 g natriumbicarbonaat ($NaHCO_3$) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.
- Kaliumchloride: los 0.22 g kaliumchloride (KCl) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.

Deze oplossingen worden gelabeld en gedateerd, en kunnen gedurende 6 maanden donker en koel bij (5 ± 3)°C bewaard worden.

## A.2 Bereiding van verdunningsmedium

Elk van de 4 stockoplossingen wordt gebruikt bij een 1:40 verdunning. Een 1 liter maatkolf wordt ongeveer halfgevuld met gedemineraliseerd water, en vervolgens wordt 25 ml van elk van de 4 stocks in de maatkolf toegevoegd, waarna er aangelengd wordt tot 1 liter met gedemineraliseerd water.
Deze oplossing wordt belucht tot minstens 90% zuurstofverzadiging en stabiele pH. Vervolgens wordt de pH gecontroleerd en als nodig bijgesteld met NaOH of HCl tot pH 7.8 ± 0.5.
Het medium is gereed voor gebruik of kan koel (5 ± 3)°C en donker bewaard worden gedurende maximum 3 maanden. De samenstelling van het medium is conform het ISO 7346-1 standaard dilutie medium.

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024
http://www.emis.vito.be
emis

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

http://www.emis.vito.be

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

Als positieve controle voor zebravisei 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 (zie BIJLAGE A):

- 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 ± 0.5 van die van verdunningsmedium
- De stockoplossing kan vervolgens donker, in de koelkast bewaard worden bij (5 ± 3)°C gedurende max. 6 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 een verdunningsreeks van 3,4 DCA met minstens 5 concentraties wordt een concentratierespons curve gegenereerd die toelaat om een EC50 waarde af te leiden. De bereiding van de verdunde testoplossingen wordt geregistreerd.

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

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

## C.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.

## C.2 Opzetten van kweekbakjes

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

- Maak kleine kweekbakjes (met tussenschot) 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 zebravissen met een ratio van 3 tegen 2 in de kweekbakken (bij voorkeur zo laat mogelijk op de dag, bv. na 16 u). Laat de geslachten gescheiden zitten overnacht door het tussenschot te plaatsen
- Verrijk de bakken met kunststof planten.
- Plaats een deksel op de bakken en minimaliseer verstoring.
- Bij gebruik van kweekbakjes met scheiding tussen geslachten wordt het tussenschot ’s morgens voorzichtig verwijderd 10 à 15 min voordat licht aangaat.
- Met het aangaan van het licht (instelling dag/nacht klok), zullen door de lichtpuls de vrouwtjes gestimuleerd worden om hun eitjes af te leggen waarna direct bevruchting volgt door de mannetjes.
- Vanaf een half uur nadat het licht is aangegaan kunnen de eitjes verzameld worden.

## C.3 Voorbereidingen voor het verzamelen van de eitjes ’s morgens bij eileg

- Breng een volume viswater (26 ± 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 zodra blijkt dat eileg heeft plaatsgevonden.
- Verwijder de binnenbak en de kunststofplanten.

http://www.emis.vito.be

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

http://www.emis.vito.be

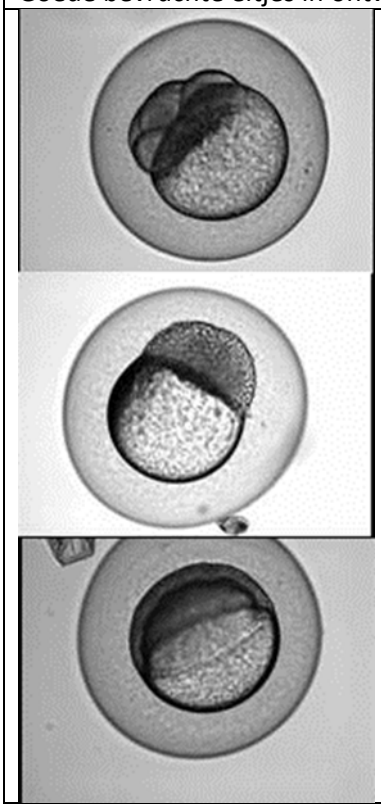
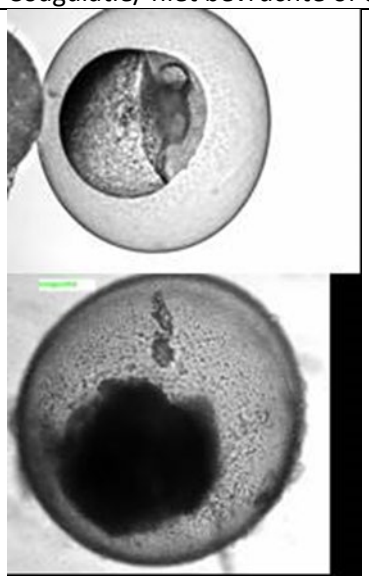
### C.4 Verzamelen van de eitjes

- Giet zeer voorzichtig en van op een zo klein mogelijke afstand de inhoud van elk van de kweekbakjes apart over een zeef.
- Plaats de zeef zo snel mogelijk in de werkoplossing MB zodat de contacttijd van de eitjes met de lucht minimaal is.
- Kijk het legsel visueel na per kweekbakje. Indien overmaat van eitjes niet bevrucht lijken in een kweekbakje, dan wordt dit in zijn geheel verwijderd, en niet gepoold met de andere 'goede' kweekbakjes.
- Herhaal de twee bovenstaande stappen voor elk van de kweekbakken.
- 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 (legsel= pool van succesvolle kweekbakjes) zijn klaar voor evaluatie van de kwaliteit: ontwikkelingsstadium en bevrucht of dood, en blijven in de petriplaat met viswater.

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

# BIJLAGE D: FOTOMATERIAAL TER ILLUSTRATIE VAN ONTWIKKELINGSFASE EN EFFECTEN OP ZEBRAVISEITJES & -LARVEN.

## D.1 Evaluatie van eitjes op dag 0

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

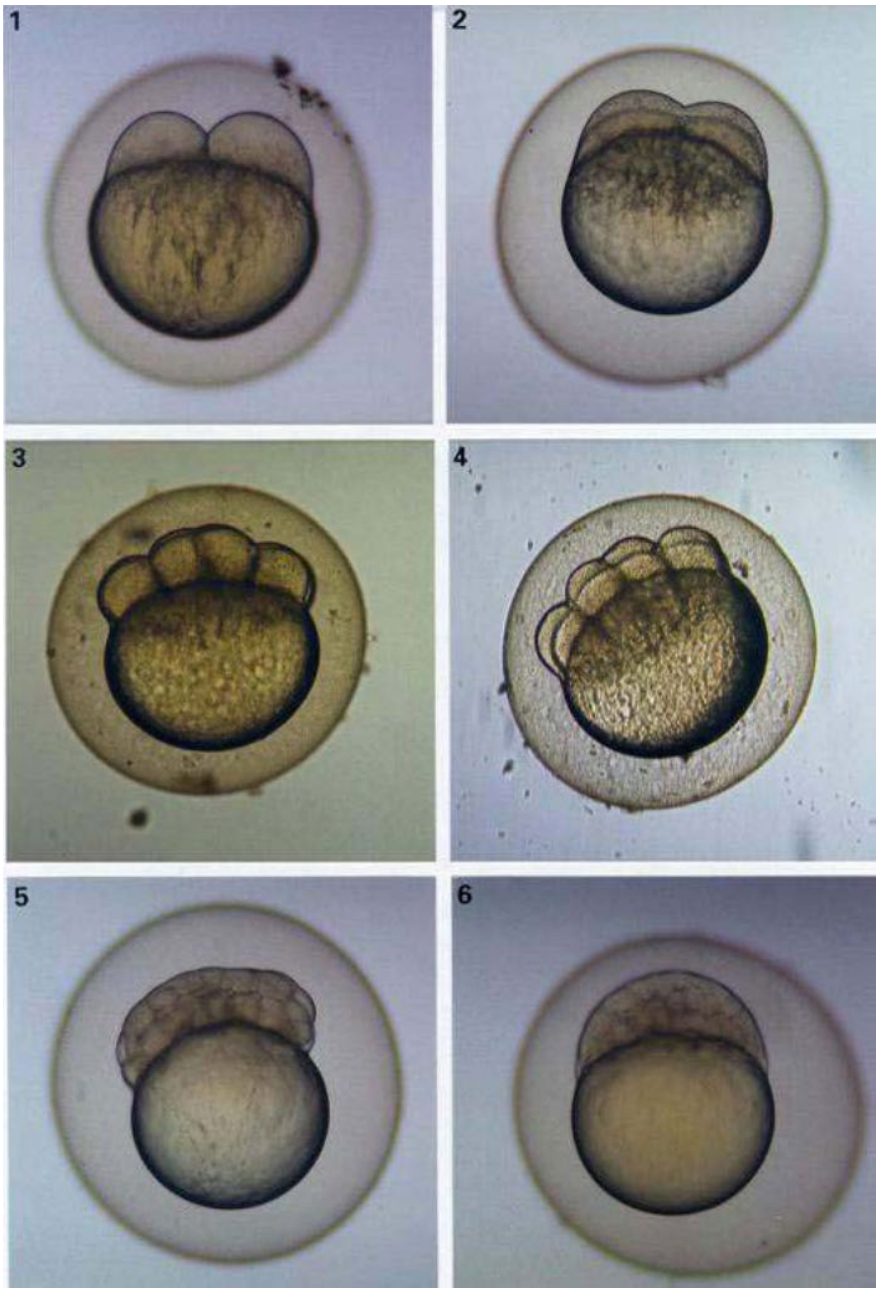
Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024
http://www.emis.vito.be
emis

Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024

http://www.emis.vito.be

## D.2 Evaluatie van synchrone ontwikkelingsstadia in 1ste uren na bevruchting

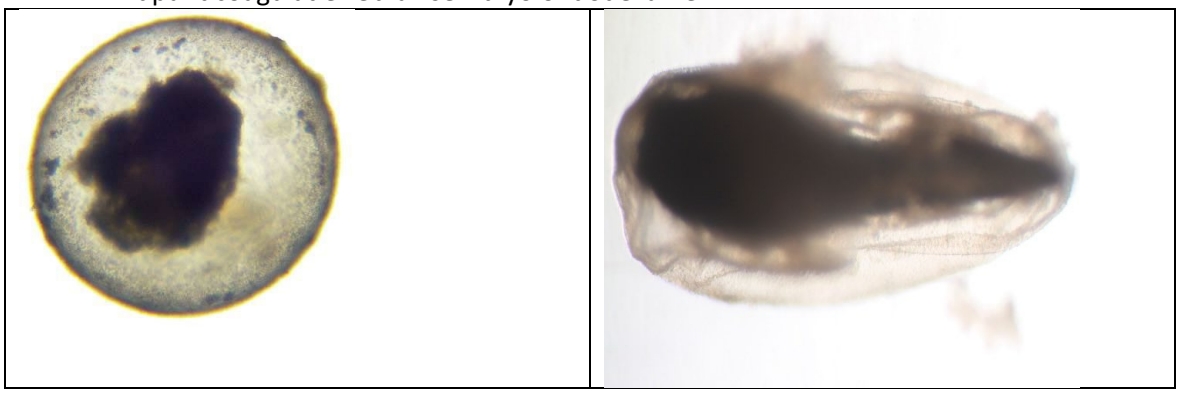
Normale ontwikkeling van zebravis embryo (*Danio rerio*): (1) 0.75 u, 2-cellig stadium; (2) 1 u, 4-cellig stadium; (3) 1.2 u, 8-cellig stadium; (4) 1.5 h, 16-cellig stadium; (5) 4.7 u, start epibolie; (6) 5.3 u, ongeveer 50 % epibolie (uit Braunbeck & Lammer 2006).



Ministerieel besluit van 07 mei 2024 --- Belgisch Staatsblad van 08 oktober 2024
http://www.emis.vito.be

## D.3 Evaluatie van 4 eindpunten voor acute toxiciteit op 96 u

1. Eindpunt coagulatie zebravisembryo of dode larve



2. Ontbreken van somieten (pijltjes)

3. Geen staartloslating (pijltje)

4. Ontbreken van hartslag (pijltje)