

Ecotoxiciteitstest met vissen: acute toxiciteit voor forel (*Oncorhynchus mykiss*)

INHOUD

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Toepassingsgebied | 3 |
| 2 | Keuze van testorganisme | 3 |
| 3 | Principe van de vistest | 4 |
| 3.1 | <i>Eindpunt voor acute toxiciteit bij vissen.</i> | 4 |
| 3.2 | <i>Limiettest</i> | 4 |
| 3.3 | <i>Verdunningsreeks</i> | 5 |
| 4 | Definities | 5 |
| 5 | Acute toxiciteit voor de juveniele regenboogforel, <i>Oncorhynchus mykiss</i> | 6 |
| 5.1 | <i>Inleiding</i> | 6 |
| 5.2 | <i>Apparatuur en materiaal</i> | 6 |
| 5.3 | <i>Reagentia en oplossingen</i> | 6 |
| 5.4 | <i>Watermonster</i> | 6 |
| 5.5 | <i>Werkwijze</i> | 7 |
| 5.5.1 | Controle medium of verdunningswater | 7 |
| 5.5.2 | Testorganismen | 8 |
| 5.5.3 | Testoplossingen van watermonsters | 9 |
| 5.5.4 | Blootstelling | 10 |
| 5.5.5 | Dagelijkse evaluatie tijdens de test | 11 |
| 5.5.6 | Berekening van resultaat voor acute toxiciteit na 96 u | 11 |
| 5.5.7 | Kwaliteitscontrole | 12 |
| 5.5.8 | Rapportering | 12 |
| 6 | REFERENTIES | 13 |
| | BIJLAGE A : Bereiding van controle- en verdunningsmedium | 14 |
| | BIJLAGE B : Kwaliteitscontrole leidingwater (OECD 203, 2019 2025) | 15 |

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de werkwijze om de acute toxiciteit voor vissen met juveniele forel als testorganisme te bepalen. 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* volgens procedure WAC/V/B/002. In bepaalde gevallen, zoals hierna beschreven, wordt er voor de juveniele forel als testorganisme gekozen.

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. Indien de fysicochemische parameter geleidbaarheid voor het zebravisembryo overschreden is, zowel bij het onverdunde watermonster (100%), alsook bij het 1:1 verdunde watermonster (**max.** 50%), dan zal men voor de vifest de juveniele regenboogforel, *Oncorhynchus mykiss* als testorganisme kiezen. Deze species heeft een bredere tolerantiegrens voor zouten.

De test voor acute toxiciteit met forel kan 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. Actuele reglementering omtrent gebruik van proefdieren kan geraadpleegd worden op de website van de cel dierenwelzijn, Vlaams departement omgeving (<https://dierenwelzijn.vlaanderen.be/wetgeving-dierenwelzijn>)

2 KEUZE VAN TESTORGANISME

Voor de juiste keuze van het testorganisme voor een vifest is meting van geleidbaarheid in het water vereist.

Meting van geleidbaarheid in het watermonster wordt in de 1^{ste} plaats getoetst aan de randvoorwaarden voor zebravisembryo, zoals dit beschreven wordt in de WAC-procedure "WAC/V/B/002: Ecotoxiciteitstest met vissen: acute toxiciteit voor zebravisembryo (*Danio rerio*)".

Enkel en alleen bij een overschrijding van de randvoorwaarde geleidbaarheid voor zebravisembryo bij zowel 100% als 50% water zal gekozen worden voor de juveniele forel als testorganisme, en wordt de procedure gevolgd zoals hierna beschreven. De criteria zijn te vinden in **Tabel 1**.

Tabel 1: Criteria voor geleidbaarheid in 100% watermonster bij keuze voor foreltest

| Parameter | Geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{cm}$) |
|--|--|
| Regenboogforel, <i>Oncorhynchus mykiss</i> | $\geq 14000 \geq 12000$ |

De meetresultaten van de geleidbaarheid, bij de gemeten concentratie van het water worden gedateerd en gerapporteerd, ter motivatie voor de keuze van het testorganisme.

3 PRINCIPE VAN DE VISTEST

3.1 EINDPUNT VOOR ACUTE TOXICITEIT BIJ VISSSEN.

De acute toxiciteitstest op juveniele regenboogforel berust op het meten van de sterfte van vissen, als maat voor acute toxiciteit na blootstelling gedurende (96 ± 2) u aan het watermonster in vergelijking met het controle medium tijdens een statische blootstelling (geen verversing van het 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. Naast sterfte worden eveneens andere zichtbare afwijkingen als uitzicht en gedrag geregistreerd.

~~In de test met zebravisembryo worden 4 eindpunten gemeten (coagulatie ei/sterfte larve; ontbreken van normale ontwikkeling somieten, ontbreken harts slag & 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 (zie WAC/V/B/002).~~

3.2 LIMIETTEST

Voor het meten van de toxiciteit van waters wordt standaard een limiettest uitgevoerd op onverdund water (100%). Indien de geleidbaarheid in het watermonsters de bovengrens overschrijdt, dan zal ~~in een limiettest~~ het watermonster verdund worden. ~~De verdunning bij overschrijding van de randvoorwaarde wordt zo gekozen dat deze overeenkomt met een geleidbaarheid van $22000 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 5\%$ (d.i. $20900\text{-}23100 \mu\text{S}/\text{cm}$).~~ Het verdunnen gebeurt in gedemineraliseerd water. Het % effect na (96 ± 2) u blootstelling aan de hoogst geteste concentratie van het water (100%, ~~of overeenstemmend met een geleidbaarheid van $\sim 22000 \mu\text{S}/\text{cm}$~~) wordt gerapporteerd, en dit telkens in vergelijking met het % effect bij blootstelling aan controle medium. ~~Bij gebruik van een verdunning door overschrijden van de randvoorwaarde geleidbaarheid, wordt het % effect in onverdund water berekend via lineaire extrapolatie.~~

3.3 VERDUNNINGSREEKS

De aanpak van een verdunningsreeks voor bepaling van een LC50, inclusief een getrapte werkwijze, is vanuit het oogpunt van dierenwelzijn en de inherente veroudering van het staal hiermee verbonden, niet meer toegelaten. De limiettest geeft voldoende evidentie voor het opsporen van acute toxiciteit.

~~Uitzonderlijk worden de testen uitgevoerd op een verdunningsreeks van het water. 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). De klassieke werkwijze op een water meteen in een reeks van minstens 5 concentraties te testen wordt niet toegepast voor de test met forel vanuit ethisch oogpunt. Een getrapte werkwijze te beginnen met één testconditie bij de hoogste testconcentratie van het watermonster wordt gestart. Indien er afwijkingen zijn (symptomen als evenwichtsverlies, hyperventilatie, geen reactie op externe stimuli) dan kan dit wijzen op toxiciteit, en wordt een volgende concentratie watermonster (1:1) gestart, enz. Dit aangepaste protocol om een test voor bepaling van een LC₅₀ uit te voeren wordt voorgesteld aan de betrokken ethische commissie, die dit moet goedkeuren. Om het lijden van proefdieren te beperken zullen in overleg met de ethische commissie humane eindpunten gedefinieerd worden, als vroege indicatie voor mortaliteit, waarbij vissen bij tussentijdse evaluatie uit de opstelling mogen verwijderd worden om euthanasie toe te passen (OECD203).~~

4 DEFINITIES

Volgende definities zijn van toepassing:

- Humane eindpunten: om lijden van proefdieren te beperken worden klinische symptomen gedefinieerd die een vroege aanwijzing zijn van letaliteit bij stervende organismen.
- 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.
- ~~LC₅₀ (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 bij overschrijding van randvoorwaarden een aangepaste verdunning van 50% of 25%) geëvalueerd in vergelijking met controle medium.
- Randvoorwaarden: voor het testmonster geldende grenzen voor fysicochemische parameters, zoals pH, O₂, geleidbaarheid, waarbij er geen effect op (acute) toxiciteit wordt verwacht ten opzichte van de controle conditie.
- Referentiestof: een referentiestof wordt 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). Acute testen met een referentiestof worden niet uitgevoerd met juveniele forel omwille van ethische redenen.
- Toxiciteit identificatie en evaluatie (TIE): onderzoek naar de oorzaken van toxiciteit door waters 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 DE JUVENIELE REGENBOOGFOREL, ONCORHYNCHUS MYKISS

5.1 INLEIDING

De uitvoering van de acute toxiciteit met juveniele regenboogforel voor waters in deze WAC-procedure is gebaseerd op 2 internationale richtlijnen, nl. ISO 7346-1 (1996) en OECD 203 (~~2019~~ 2025).

Deze test wordt uitgevoerd met juveniele vissen, die als proefdier beschouwd worden en waarvoor een aanvraag moet gebeuren bij de ethische commissie, nadat het laboratorium ook een erkenning kreeg voor het gebruik van proefdieren. Specifieke informatie omtrent de vereisten bij het werken met forellen voor toxiciteitstesten is te bekomen bij het Vlaamse departement omgeving, cel dierenwelzijn (<https://dierenwelzijn.vlaanderen.be/wetgeving-dierenwelzijn>).

Voor uitvoering van experimenten met juveniele regenboogforel dient men de vissen aan te kopen bij een leverancier, en de proefdieren in het labo te huisvesten rekening houdend met wetgeving dierenwelzijn. 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
- 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 ammonium
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg
- Klimaatkamer of koelsysteem voor aquaria, met dag/nacht cyclus
- Beluchting systeem (olie-vrij), met vertakkingen naar aquaria
- Pipetten en toebehoren
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven, maatcilinders voor bereiding van testoplossingen en verdunningen
- Glazen aquaria, met een inhoud die voldoet aan de maximale belading tijdens de test van (1 ± 0.1) g vis/liter testoplossing (zie 5.5.4) met afdekplaat.

5.3 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Leidingwater, mits voldoende kwaliteit om vissen tijdens acclimatisatie en gedurende langere tijd huisvesting in gezonde conditie en zonder stress te houden (voor waterkwaliteit zie 5.5.1)
- Gedemineraliseerd water (< 10 µS/cm).
- Verdovingsmiddel voor euthanasie van de vissen (product en gebruik volgens aanvraag ethische commissie)

5.4 WATERMONSTER

Voor de monsternamen 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, en op kamertemperatuur gezet.

Naast de meting van geleidbaarheid bij keuze van testorganisme (zie 2) worden eveneens pH, zuurstof, en ammonium gemeten en gerapporteerd als randvoorwaarden. Voor deze parameters zijn er aanvaardbare ranges gedefinieerd waarbij er geen effect in de vorm van acute toxiciteit voor de forel zou optreden (**Tabel 2**).

Tabel 2: Randvoorwaarde voor fysicochemische parameters voor juveniele regenboogforel.

| Parameter | pH | Zuurstof (mg/l) | Geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{cm}$) | Ammonium (mg/l NH_4^+ , pH 8) ¹ |
|--|-----------|-----------------|--|---|
| Regenboogforel, <i>Oncorhynchus mykiss</i> | 6.0 – 9.0 | ≥ 5 | ≥ 12000 en ≤ 22000 | < 18.0 |

g.d.: geen data

Indien de pH van het watermonster buiten de toegelaten range valt (< 6.0 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, belucht². De aanpassingen voor pH en zuurstof worden gerapporteerd.

Indien de geleidbaarheid in het watermonsters de bovengrens overschrijdt, dan zal ~~in een limiettest~~ het watermonster verdund worden. ~~De verdunning bij overschrijding van de randvoorwaarde wordt zo gekozen dat deze overeenkomt met een geleidbaarheid van 22000 $\mu\text{S}/\text{cm} \pm 5\%$ (d.i. 20900-23100 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Het verdunnen gebeurt in gedemineraliseerd water. Deze aanpassing met het resultaat voor geleidbaarheid wordt gerapporteerd. tot 50% als hoogste concentratie, of tot 25% om te voldoen aan de toegelaten range voor geleidbaarheid. Bij het testen van een verdunningsreeks zal het watermonster zodanig verdund worden dat de hoogste concentratie van de reeks overeenkomt met een geleidbaarheid van 22000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, en van daaruit 1:1 verder verdund worden om te testen in een getrapte procedure voor bepaling van een LC_{50} .~~

De metingen van ammonium worden gerapporteerd. In geval van afwijkende randvoorwaarden voor ammonium 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

Voor de vistest met juveniele forel is het toegelaten om leidingwater (drinkwater) te gebruiken als controle medium en verdunningswater, mits van voldoende kwaliteit. Dit betekent dat de vissen die tijdens quarantaine, acclimatisatie en gedurende langere tijd huisvesting in het labo op dit

¹ Randvoorwaarde ammonium bij pH > 8 kan lager zijn vanwege hogere toxiciteit, maar data ontbreken.

² Bovendien wordt het zuurstofgehalte op peil gehouden tijdens de blootstelling door continue beluchting.

leidingwater, in een gezonde conditie blijven, en geen stress ondervinden. Verder zal via analyse de kwaliteit van het leidingwater worden aangetoond, en interferentie met resultaten voor toxiciteit bij gebruik als verdunningswater worden uitgesloten. Daarom moet er minstens 1x/jaar een meting worden uitgevoerd van de kwaliteitsparameters, zoals opgelijst in annex 3 van de OECD 203 richtlijn (zie parameter lijst in BIJLAGE B).

Indien het beschikbare leidingwater niet van voldoende kwaliteit is zal men de nodige maatregelen nemen (bijv. dechlorering), of men moet gebruik maken van gereconstitueerd medium, vertrekkende van 4 zouten om controle medium of verdunningswater, te bereiden conform de samenstelling zoals voorgeschreven in ISO 7346-1 richtlijn. Een werkwijze voor de bereiding van stockoplossingen (40x), en verdunning tot controle medium of verdunningswater (ook viswater genoemd) wordt gegeven in BIJLAGE A.

5.5.2 TESTORGANISMEN

5.5.2.1 HERKOMST FORELLEN

Voor de beoordeling van waters met een hogere geleidbaarheid en zoutgehalte (zie **Tabel 1**) wordt in Vlaanderen de vissoort *Oncorhynchus mykiss* gebruikt. Het labo heeft een erkenning als proefdierlabo en een aanvraag bij de ethische commissie werd goedgekeurd voor uitvoering van acute toxiciteit met forel, zodat men in regel is met de wetgeving dierenwelzijn (KB, 29 mei 2013; <https://dierenwelzijn.vlaanderen.be/proefdieren>).

Men wendt zich tot een externe leverancier voor de aankoop van juveniele forellen, waarbij criteria voor aanbevolen grootte van de vissen in acht wordt genomen (Tabel 3).

Elke partij vissen moet organismen van eenzelfde soort en vergelijkbare leeftijd (~ lengteklasse) bevatten, en wordt in het labo geregistreerd met een partijnummer waarnaar gerefereerd kan worden bij gebruik in de testen. De kwaliteit van de geleverde vissen moet door de leverancier gedocumenteerd worden.

5.5.2.2 GOEDKEURING VAN PARTIJ FORELLEN VOOR EEN TEST

Alle vissen die gebruikt worden voor een test moeten vooraf minstens 9 dagen in het laboratorium aanwezig zijn en voldoen aan gezondheidscriteria zoals hierna beschreven (OECD203, ~~2019~~ 2025).

Elke partij in het labo wordt geregistreerd, met type water in de aquaria, beluchting, gebruik van filters voor zuivering of verversingsregime, dagelijkse opvolging van de gezondheid van de vissen (sterfte en andere visuele observaties), registratie van voeding, van eventuele behandeling voor ziekte, en regelmatige registratie van waterkwaliteitsparameters, als pH, zuurstof, temperatuur, hardheid, N-verbindingen als nitriet, ammonium... (zie ook KB, 29 mei 2013).

Wanneer het de aankoop van een nieuwe partij vissen betreft, dan moet deze partij eerst een quarantaineperiode passeren, die bestaat uit 48 uur gewenningsperiode, gevolgd door 7 dagen acclimatisatie (=totaal 9 dagen). De vissen worden in die periode op hetzelfde water gehouden, als hetgeen gebruikt wordt als controle medium en verdunningswater voor de testen. Ook de omgevingscondities (dag/nacht ritme, en temperatuur) zijn in dezelfde range als deze voor de test (zie 5.5.4). De bedoeling van deze 9-dagen periode is om de gezondheidstoestand van de vissen te volgen en enkel wanneer aan onderstaande voorwaarden wordt voldaan mogen de vissen gebruikt worden voor de geplande testen.

Bij aankomst in het labo worden de vissen 30 minuten geacclimatiseerd door de plastic transportzakken gesloten en ondergedompeld te houden in het quarantaineaquarium, vooraleer de toegekomen vissen vrij te laten in het aquarium water. Na een gewenningsperiode van 48 uur volgt

een acclimatisatieperiode van 7 dagen. De sterfte, alsook andere visuele observaties als gedrag, misvormingen, tekenen van infectie bij de partij vissen wordt dagelijks genoteerd gedurende deze periode. Voor de 7 dagen acclimatisatieperiode wordt de conditie van de partij vissen getoetst:

- Sterfte > dan 10%: partij wordt afgekeurd;
- Sterfte < 5%: partij wordt vrijgegeven voor gebruik in de testen;
- Sterfte tussen 5 en 10%: een 2^{de} periode van 7 dagen acclimatisatie wordt gestart. Wanneer tijdens deze 2^{de} periode > 5% sterfte, dan wordt de partij alsnog afgekeurd. Enkel bij < 5 % sterfte na de 2^{de} acclimatisatieperiode kan de partij goedgekeurd worden voor toxiciteit testen.

Nadat een aquarium met vissen goedgekeurd is, komen deze organismen in stock (per partij). Vissen van verschillende partijen mogen nooit gedurende de periode van acclimatisatie en stockage samengebracht worden. Voor gebruik in één test zullen de organismen steeds afkomstig zijn van dezelfde partij, hetzij direct na quarantaine, hetzij vanuit de stock.

Vissen in stock kunnen gebruikt worden voor een test, op voorwaarde dat er geen sterfte is en de vissen gedurende de laatste 14 dagen vóór gebruik in de testen geen tekenen vertonen van stress, ziekte, kwetsuren of misvormingen. Indien bij vissen in stock een behandeling tegen ziekte of parasieten toegepast werd, dan zal dit ook geregistreerd worden in het logboek van dagelijkse opvolging. Men zal vanaf het einde van dergelijke behandeling terug 14 dagen moeten wachten en de gezondheidstoestand verifiëren deze periode vooraleer de vissen geschikt zijn om te gebruiken voor een test.

Tabel 3: Aanbevelingen voor testorganisme juveniele regenboogforel.

| Testorganisme | Lengte klasse (cm) | Temperatuur range (°C) | Lichtperiode (uur) | Voedseltype |
|--|--------------------|------------------------|--------------------|--------------|
| Regenboogforel, <i>Oncorhynchus mykiss</i> | 5.0 ± 2.0 | 13-17 | 12-16 | Forel korrel |

5.5.2.3 VOORBEREIDING VAN FORELLEN VOOR EEN TEST

- Verblijf gedurende 7 dagen voor aanvang van de test in de omgevingscondities (temperatuur, dag/nacht ritme) en watertype zoals gebruikt wordt als controle en verdunningsmedium in de toxiciteitstest, met dagelijkse opvolging.
- Dagelijks voederen, tot 48 u voor aanvang van de test.
- Voor een representatief deel van de partij vissen die gebruikt zullen worden voor een test (bijv. 10 vissen) wordt het gemiddeld gewicht bepaald, in de periode 3-7 dagen voor aanvang van de test door de vissen in een klein volume water te wegen (hetgeen vooraf gewogen werd), op basis waarvan men een gemiddeld gewicht per vis kan bepalen. Dit resultaat wordt gedateerd en geregistreerd, en is nodig om het vereiste testvolume te bepalen (zie 5.5.4.1).

5.5.3 TESTOPLOSSINGEN VAN WATERMONSTERS

Het water wordt op temperatuur overeenkomstig de testrange (13-17°C) gebracht, en goed gehomogeniseerd voor gebruik. De testoplossingen met watermonsters worden vers bereid tot maximum 4 uur voor aanvang van de test.

Voor elk van de testoplossingen wordt een volume voorzien dat voldoet aan de vereiste qua belading vissen, max. (1 ± 0.1) gram vis/liter testoplossing, en het aantal vissen per testconditie (zie 5.5.3.1).

5.5.3.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

Het water wordt standaard in een limiettest geëvalueerd als onverdund water (hoogste testconcentratie of 100% water), en dit in vergelijking met een controle conditie (leidingwater of 100% verdunningswater). Indien de randvoorwaarde voor geleidbaarheid voor forel is overschreden kan de hoogste concentratie van het watermonster in de limiettest **aangepast worden door een verdunning met gedemineraliseerd water tot de bovengrens van geleidbaarheid, 22000 $\mu\text{S}/\text{cm} \pm 5\%$. 50%, uitzonderlijk 25% zijn.**

5.5.3.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR LC_{50} BEPALING

Een verdunningsreeks (zelfs in een getrapte benadering) wordt niet langer uitgevoerd met juveniele forel.

~~Indien van toepassing (bijv. volgens bijzondere voorwaarde in vergunning van het bedrijf) moet het watermonster in een verdunningsreeks getest worden om een LC_{50} -waarde te bepalen. Hiervoor wordt het water verdund met verdunningswater (zie 5.5.1) of leidingwater. Een trapsgewijze aanpak is hier vereist om het gebruik van proefdieren, en het onnodig lijden van dieren te beperken. In samenspraak met de ethische commissie wordt een proefopzet uitgewerkt die toelaat om, indien van toepassing, een LC_{50} te bepalen.~~

5.5.4 BLOOTSTELLING

5.5.4.1 BLOOTSTELLINGSCONDITIES

- Duur: (96 ± 2) u
- Licht-donker cyclus: 16 u licht/8 u donker.
- Temperatuur van testoplossingen: $(15 \pm 2)^\circ\text{C}$ tijdens blootstelling, een temperatuur-gecontroleerde kamer of koelsysteem te gebruiken voor de testuitvoering. Gedurende de verschillende dagen van de test, en tussen testaquaria onderling mag de temperatuur niet meer dan 2°C verschillen, binnen de range van 13 tot 17°C .
- Belading vissen: maximum (1 ± 0.1) gram vis/liter testoplossing.
- Testorganismen: ~~9-7~~ per testconditie in een limiettest, ~~7~~ per testconditie in een verdunningsreeks.
- Volume testoplossing: minimum volume wordt bepaald aan de hand van criterium max. 1 gram vis/liter testoplossing, met gegevens van het gemiddeld gewicht van een vis uit de partij (zie 5.5.2.3) en het aantal/testconditie.
- Testrecipiënt: glazen aquaria met deksel, met inhoud die voldoende is voor het vereiste volume/testoplossing voor 7 vissen in een ~~verdunningsreeks of 9 vissen in een~~ limiettest.
- Beluchting: er wordt luchtdoorborreling voorzien in de aquaria, zodat 60% saturatie verzekerd is.
- Statische blootstelling (geen waterverversing).
- Geen voeding.
- Replica's: geen.
- Minstens dagelijks tot 2x daags evaluatie van de vissen ~~in een limiettest, zowel bij de limiettest als test met verdunningsreeks.~~

5.5.4.2 TRANSFER FORELLEN NAAR TESTOPLOSSING IN AQUARIA

- De aquaria worden gevuld met het vereiste volume van de testoplossing (hoogste concentratie watermonster voor limiettest, ~~of verdunningsreeks van het watermonster~~) en een aquarium voor controle conditie (idem als verdunningswater: leidingwater of gereconstitueerd viswater).

- De aquaria worden voorzien van beluchting.
- De forellen, geschikt bevonden en geacclimatiseerd voor de test worden per 7 stuks of 9 stuks in elk van de aquaria geplaatst.
- De fysicochemische metingen voor pH, zuurstof en temperatuur worden in de aquaria uitgevoerd waarna ze afgedekt worden.

5.5.5 DAGELIJKE EVALUATIE TIJDENS DE TEST

- Binnen 2 à 3 uur na opstart van de test moet een 1^{ste} observatie van de testorganismen gedaan worden. Sterfte wordt geregistreerd, maar eveneens andere zichtbare afwijkingen moeten genoteerd worden en kunnen als humane eindpunten gescoord worden op basis een vis als stervende wordt beoordeeld, die men mag verwijderen voor euthanasie. Humane eindpunten betreft ondermeer verlies van evenwicht (bv. Zinken naar bodem), gewijzigd ademhalingsgedrag (bv. Hyperventilatie), reactievermogen (bv. niet reageren op stimulus) of zwemgedrag (bv. Niet actief zwemmen). De dode vissen worden onmiddellijk bij observatie uit het aquarium verwijderd en afgevoerd als chemisch, biologisch afval.
- Minstens elke 24 u na start van de test tot en met (96 ± 2) u zullen terug observaties van testorganismen plaatsvinden, en effecten zoals hiervoor vermeld voor dag 0, na 2 à 3 u geregistreerd worden, terwijl de dode vissen verwijderd worden. Vanuit belang voor dierenwelzijn wordt aanbevolen om een tussentijdse evaluatie (dus tot 2x/dag) te doen om dode dieren te verwijderen. Dit wordt overeenkomstig per dag geregistreerd. Er worden eveneens dagelijkse metingen van pH, zuurstof en temperatuur in alle aquaria uitgevoerd en geregistreerd op laboformulier.
- Bij het einde van de test, op (96 ± 2) u na registratie van al de observaties van forellen, en fysicochemische metingen wordt de test beëindigd. De nog-levende vissen in de testoplossingen van water worden gedood via euthanasie met een hoge dosis verdovingsmiddel. De levende vissen in de controle conditie moeten niet dood gemaakt worden, en zouden in aanmerking kunnen komen voor hergebruik³ onder strikte condities (in goede conditie, en minstens 7 dagen in stock vooraleer te gebruiken bij een nieuwe toxiciteitstest).

5.5.6 BEREKENING VAN RESULTAAT VOOR ACUTE TOXICITEIT NA 96 U

5.5.6.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT NA 96 U BLOOTSTELLING

De meting van acute toxiciteit voor de forel test baseert zich op het resultaat van cumulatieve sterfte na (96 ± 2) u blootstelling, ten opzichte van het aantal forellen bij start van de test ($n=97$). Het resultaat wordt omgerekend in % van organismen met een acuut effect voor de hoogst geteste concentratie van het water en voor de controle conditie. **Bij verdunning van het afvalwater, door overschrijding van de randvoorwaarde geleidbaarheid, zal men het % gemeten effect extrapoleren naar een schatting van % effect voor het onverdunde afvalwater, en als dusdanig beide effect % overeenkomstig % afvalwater rapporteren.**

5.5.6.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR LC₅₀ BEPALING NA 96 U BLOOTSTELLING

Een verdunningsreeks, zelf met getrapte benadering, is niet langer toegelaten.

- ~~Voor elke concentratie water en voor de controlegroep wordt het cumulatief aantal dode vissen geteld na (96 ± 2) u, en uitgedrukt als % effect na 96 u blootstelling ten opzichte van het aantal levende vissen ($n=7$) bij start van de test. De berekening is naar analogie met de limiettest.~~

³ Hergebruik te definiëren bij de aanvraag proefdierexperimenten bij de ethische commissie

- ~~De resultaten van % effect (Y-as) worden grafisch voorgesteld als functie van de concentratie (% verdunning) van het water (X-as) in vergelijking met het % effect van de controle. Een LC₅₀ waarde kan afgeleid worden indien een goede concentratie-effect relatie, en er een conditie is met ~0% effect en een conditie met ~100% effect.~~
- ~~Een LC₅₀ waarde voor 96 u blootstelling 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 LC₅₀ 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 moet steeds ~~8~~ 6 van totaal ~~7~~ 9 vissen zijn bij een limiettest, ~~en 6 van totaal 7 vissen zijn bij een verdunningsreeks~~ na (96 ± 2) u blootstelling.
- Het zuurstofgehalte in alle testoplossingen moet ≥ 5 mg/l zijn.

De gegevens van overleving in de controle conditie worden van alle testen bijgehouden in een limietkaart.

Herkomst en kwaliteit van testorganismen:

- De herkomst en gezondheid van de goedgekeurde partij vissen, gebruikt als testorganisme kan aangetoond worden via registraties van levering, dagelijkse opvolging ~~tijdens 7-dagen~~ acclimatisatie ~~vóór aanvang van een test~~ en huisvesting in het labo.
- Het criterium wat betreft belading vissen tijdens de test, max. 1 ± 0.1 g/l werd gerespecteerd, en kan aangetoond worden via laboregistraties van bepaling van gemiddelde gewicht vis van de gebruikte partij vissen, en het testvolume water per conditie.

5.5.7.2 TWEEDELIJNSCONTROLE

Er worden geen testen met referentiestof uitgevoerd om proefdierexperimenten in belang van dierenwelzijn te beperken.

5.5.7.3 OPVOLGING VAN AFWIJINGEN

Indien de resultaten van de testen met betrekking tot geldigheidscriteria, ~~of bij afwijkende concentratie-effect curves bij een verdunningsreeks van een water,~~ niet voldoen 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 monster, 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, partij), 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=96u
 - % effect na (96 ± 2) u in controle en watermonster, met de geteste concentratie (limiettest). Indien bij overschrijding van randvoorwaarde geleidbaarheid een aanpassing werd gedaan, dan wordt ook een geïnterpoleerd % effect voor een 100% afvalwater gerapporteerd. ~~of~~
 - ~~LC₅₀ voor acute effecten na (96 ± 2) u bij verdunningsreeks van water, met % effect in de hoogst geteste concentratie van het watermonster en grafiek voor concentratie-effect op 96 u.~~
- Opmerkingen en afwijkingen.

6 REFERENTIES

- 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.
- 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 2025) Fish, acute toxicity 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/002. Ecotoxiciteitstest met vissen: acute toxiciteit voor zebravisembryo (*Danio rerio*).

BIJLAGE A: BEREIDING VAN CONTROLE- EN VERDUNNINGSMEDIUM

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 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.
- Magnesiumsulfaat: los 4.93 g magnesiumsulfaat heptahydraat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 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 $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ ($3 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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 $\text{pH } 7.8 \pm 0.5$.

Het medium (ook viswater genoemd) is gereed voor gebruik of kan koel $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ ($3 \pm 2)^\circ\text{C}$ en donker bewaard worden gedurende maximum 3 maanden. De samenstelling van het medium is conform het ISO 7346-1 standaard dilutie medium (**Tabel 4**).

Het verdunningsmedium of viswater wordt op de gewenste testtemperatuur gebracht en belucht voor gebruik in de testen.

Tabel 4: Samenstelling van controle- en verdunningsmedium (viswater) in de vis test

| Zout | Concentratie (mg/l) |
|---|---------------------|
| NaHCO_3 | 63 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 294 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 123.3 |
| KCl | 5.5 |

BIJLAGE B: KWALITEITSCONTROLE LEIDINGWATER (OECD 203, 2019 2025)

| Parameter | Maximum concentration |
|--|-----------------------|
| Particulate matter | 5 mg/L |
| Total organic carbon (TOC) ¹¹ | 2 mg/L |
| Un-ionised ammonia (NH ₃) | 1 µg/L |
| Nitrate (NO ₃) | <9 mg/L ¹² |
| Residual chlorine | 10 µg/L |
| Total organophosphorus pesticides | 50 ng/L |
| Total organochlorine pesticides plus polychlorinated biphenyls | 50 ng/L |
| Total organic chlorine | 25 ng/L |
| Aluminium (Al) | 1 µg/L |
| Arsenic (As) | 1 µg/L |
| Chromium (Cr) | 1 µg/L |
| Cobalt (Co) | 1 µg/L |
| Copper (Cu) ¹³ | 1 µg/L |
| Iron (Fe) | 1 µg/L |
| Lead (Pb) | 1 µg/L |
| Nickel (Ni) | 1 µg/L |
| Zinc (Zn) | 1 µg/L |
| Cadmium (Cd) | 100 ng/L |
| Mercury (Hg) | 100 ng/L |
| Silver (Ag) | 100 ng/L |
| Chemical oxygen demand (COD) ¹⁴ | 5 mg/L |

¹¹ High levels of total organic carbon (TOC) are an indication of high amounts of dissolved organic carbon (DOC), which potentially bind with the test chemical (organic chemicals and metal compounds that demonstrate sorption) and therefore reduce the bioavailable amount as well as the toxicity of the test chemical. DOC is operationally defined as organic molecules that pass through a filter, most often 0.45 µm.

¹² "A maximum level of 2 mg NO₃-N/L would be appropriate for protecting the most sensitive freshwater species"; equaling 8.85 mg NO₃/L (Camargo JA, Alonso A, Salamanca A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. Chemosphere 58(9):1255-67.

¹³ Note that copper pipes or compositions containing copper (alloys) may cause fish to die (LC₅₀ fathead minnow: 0.073 mg/L).

¹⁴ COD or TOC should be measured.