

bron :

Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen

PB L 290 van 29/11/98

RICHTLIJN 98/73/EG VAN DE COMMISSIE

van 18 september 1998

tot vierentwintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen

BIJLAGE III D

C.13. BIOCONCENTRATIE: DOORSTROOMTEST MET VISSSEN

(Voor de EER relevante tekst)

1. METHODE

Deze methode voor het meten van de bioconcentratie stemt overeen met OESO-methode TG 305 (1996).

1.1. Inleiding

Deze methode betreft een procedure voor de bepaling van het bioconcentratiegedrag van stoffen in vissen in een "flow-through"-situatie (doorstromend water). Hoewel een doorstroomtest veruit te verkiezen is, mag eventueel ook in semi-statische omstandigheden worden gewerkt voorzover aan de validiteitscriteria wordt voldaan.

De beschrijving van de methode omvat alle bijzonderheden die nodig zijn om de test te kunnen uitvoeren; er blijft voldoende ruimte om de proefopzet aan te passen aan de omstandigheden in het betrokken laboratorium en de specifieke karakteristieken van de teststof. De methode is bij uitstek geschikt voor stabiele organische verbindingen met een $\log P_{ow}$ -waarde tussen 1,5 en 6,0 (1), maar mag niettemin ook worden toegepast op superlipofiele stoffen (met een $\log P_{ow} > 6,0$). De voorlopige (a priori) schatting van de bioconcentratiefactor ("BCF" of ook wel " K_B ") zal voor dergelijke superlipofiele stoffen meestal hoger zijn dan de met behulp van laboratoriumexperimenten bepaalde bioconcentratiefactor in de stationaire situatie (BCF_{SS}). Een preliminaire schatting van de bioconcentratiefactor van organische stoffen met een $\log P_{ow}$ -waarde die 9,0 of minder bedraagt, kan worden verkregen door toepassing van de vergelijking van Bintein et al. (2). De parameters die het bioconcentratiegedrag karakteriseren, omvatten de opnamesnelheidsconstante (k_1), de depuratiesnelheidsconstante (k_2) en de BCF_{SS} .

Het gebruik van radioactief gemerkte teststoffen kan de analyse van de water- en vismonsters vergemakkelijken en laat ook toe te bepalen of het noodzakelijk is eventuele afbraakstoffen te identificeren en

te kwantificeren. Indien de totale hoeveelheid radioactieve residu's wordt gemeten (bijvoorbeeld door verbranding of weefselsolubilisatie), heeft de gemeten BCF betrekking op de oorspronkelijke verbinding, de eventueel achterblijvende metabolieten daarvan en de geassimileerde koolstof. BCF-waarden die worden bepaald op basis van de totale hoeveelheid radioactieve residu's zijn derhalve niet zonder meer vergelijkbaar met BCF-waarden die worden verkregen door een specifieke chemische bepaling van (uitsluitend) de oorspronkelijke verbinding.

In studies met radioactieve merkers kan eventueel door toepassing van zuiveringstechnieken de BCF-waarde voor de oorspronkelijke verbinding worden bepaald; desgewenst kunnen de belangrijkste metabolieten worden gekarakteriseerd. Ook kan door analyse en identificatie van de residuen in de weefsels een studie van het metabolisme van de vissen met een bioconcentratieonderzoek worden gecombineerd.

1.2. Definities en eenheden

Bioconcentratie/bioaccumulatie is de toename van de concentratie van de teststof in of op een organisme (of bepaalde weefsels daarvan) ten opzichte van de concentratie van die stof in het omringende medium.

De bioconcentratiefactor (BCF of K_B) op enig moment van de opnamefase van deze accumulatie-test, is de verhouding van de concentratie van de teststof in of op de vis of bepaalde weefsels daarvan (C_f in $\mu\text{g/g}$ (ppm)) en de concentratie van die stof in het omringende medium (C_w in $\mu\text{g/ml}$ (ppm)).

De bioconcentratiefactor in stationaire situatie (BCF_{SS} of K_B) ondergaat gedurende langere tijd geen significante wijzigingen als de concentratie van de teststof in het omringende medium constant blijft.

Een plateau (stationaire toestand) wordt bereikt wanneer in een grafiek van de concentratie van de teststof in de vissen (C_f) als functie van de tijd de curve evenwijdig gaat lopen met de tijdas en drie opeenvolgende bepalingen van C_f op monsters die met tussenpozen van ten minste twee dagen worden genomen, niet meer dan 20 % van elkaar verschillen en er bovendien geen significant verschil bestaat tussen de waarden verkregen op de drie bemonsteringstijdstippen. Wanneer de analyse op samengevoegde monsters wordt uitgevoerd, zijn ten minste vier opeenvolgende bepalingen vereist. Voor teststoffen die langzaam worden opgenomen, verdient het de voorkeur om intervallen van zeven dagen te gebruiken.

Een bioconcentratiefactor die rechtstreeks uit de snelheidsconstanten (k_1/k_2) wordt berekend, wordt kinetische bioconcentratiefactor (BCF_k) genoemd.

De octanol-water-partiticoëfficiënt (P_{ow} of K_{ow}) is de verhouding van de oplosbaarheid van een stof in n-octanol en in water bij evenwicht (methode A.8). De logaritme van P_{ow} is een indicator van de neiging tot bioconcentratie van een chemische stof in aquatische organismen.

De blootstellings- of opnamefase is de periode gedurende welke de vissen aan de teststof worden blootgesteld.

De opnamesnelheidsconstante (k_1) is het cijfer dat aangeeft hoe snel de concentratie van de teststof in of op de proefdieren (of bepaalde weefsels daarvan) toeneemt wanneer de vissen aan die stof worden blootgesteld

(k_1 wordt uitgedrukt in dag^{-1}).

De op de blootstellingsfase volgende depuratiefase (eliminatiefase) is de periode die begint op het moment dat de proefdieren van een medium dat de teststof bevat, worden overgebracht naar een medium dat die stof niet bevat, en gedurende welke de depuratie (of netto eliminatie) van de teststof uit de vis (of bepaalde weefsels daarvan) wordt bestudeerd.

De depuratie- (of eliminatie-)snelheidsconstante (k_2) is het cijfer dat aangeeft hoe snel de concentratie van de teststof in het proefdier (of bepaalde weefsels daarvan) afneemt nadat de vis is overgebracht van een medium dat de teststof bevat naar een medium dat die stof niet bevat (k_2 wordt uitgedrukt in dag^{-1}).

1.3. Principe van de testmethode

De test omvat twee fasen: de blootstellingsfase (opnamefase) en de daaropvolgende depuratiefase. Gedurende de opnamefase worden afzonderlijke groepen vissen van dezelfde soort blootgesteld aan ten minste twee concentraties van de teststof. Met de overbrenging van de vissen naar een medium dat de teststof niet bevat, wordt de depuratiefase ingeluid. Een depuratiefase is altijd noodzakelijk, tenzij er zich tijdens de blootstellingsfase nauwelijks enige opname van de stof heeft voorgedaan (d.w.z. als de BCF minder dan 10 bedraagt). De concentratie van de teststof in of op de vissen (of bepaalde weefsels daarvan) wordt systematisch gedocumenteerd gedurende de beide fasen van de test. Naast de groepen vissen die aan de twee testconcentraties worden blootgesteld, wordt ook een controlegroep vissen gehouden onder - afgezien van de afwezigheid van de teststof - identieke omstandigheden. Op die manier kunnen de schadelijke effecten die eventueel in de bioconcentratietest worden waargenomen, worden gerelateerd aan waarnemingen op een passende controlegroep en kan een "nuleffectbepaling" van de concentraties van de teststof worden uitgevoerd.

De opnamefase duurt 28 dagen tenzij wordt aangetoond dat de evenwichtstoestand eerder wordt bereikt. Een raming van de duur van de opnamefase en de tijd die nodig is om de stationaire toestand (dynamisch evenwicht) te bereiken, kan worden verkregen met behulp van de vergelijking in aanhangsel 3. Vervolgens wordt de depuratiefase aangevat: de vissen worden overgebracht naar een nieuwe, schone bak die hetzelfde medium, maar zonder de teststof, bevat. Zo mogelijk wordt de bioconcentratiefactor op twee manieren berekend: als bioconcentratiefactor in stationaire situatie (BCF_{SS}), d.w.z. als de verhouding van de concentratie in de vissen (C_f) en in het water (C_w) bij kennelijk dynamisch evenwicht, en als kinetische bioconcentratiefactor (BCF_k), d.w.z. als de verhouding van de snelheidsconstanten k_1 (opname) en k_2 (depuratie), uitgaande van een eersteordekinetiek. Als duidelijk is dat het proces niet door een eersteordekinetiek kan worden beschreven, moet een complexer model worden gebruikt (zie aanhangsel 5).

Indien na 28 dagen nog geen stationaire toestand (dynamisch evenwicht) is bereikt, dient de opnamefase te worden verlengd met 60 dagen, tenzij de stationaire toestand eerder wordt bereikt; dan wordt de depuratiefase aangevat.

De opnamesnelheidsconstante, de depuratie- (eliminatie-)snelheidsconstante (of -constanten, indien een complexer model vereist is), de bioconcentratiefactor en, zo mogelijk, een betrouwbaarheidsinterval voor elk van deze parameters worden berekend aan de hand van het model dat de gemeten concentraties van de teststof in de vissen en het water het beste beschrijft.

De BCF wordt berekend aan de hand van het totale versgewicht van de vis. Voor bepaalde doeleinden mogen

evenwel ook specifieke weefsels of organen (bijvoorbeeld spieren, lever) worden gebruikt als de vissen groot genoeg zijn of als zij kunnen worden opgedeeld in een eetbaar ("filet") en een niet-eetbaar ("ingewanden") gedeelte. Aangezien er voor veel organische stoffen een duidelijk verband bestaat tussen neiging tot bioconcentratie en lipofilie, bestaat er een overeenkomstig verband tussen het vetgehalte van de in de proeven gebruikte vissen en de waargenomen bioconcentratie van die stoffen. Om deze bron van variatie in de testresultaten voor stoffen met een goede oplosbaarheid in vetten (d.w.z. met $\log P_{ow} > 3$) te verkleinen, dient de mate van bioconcentratie niet alleen te worden berekend op basis van de totale lichaamsmassa maar ook op basis van de vetfractie.

Het vetgehalte dient, voorzover mogelijk, te worden bepaald op hetzelfde biologisch materiaal waarop ook de concentratie van de teststof wordt bepaald.

1.4. Gegevens betreffende de teststof

Alvorens met de bioconcentratietest wordt begonnen, moeten de volgende gegevens over de teststof bekend zijn:

- a. oplosbaarheid in water;
- b. octanol-water-partitiecoëfficiënt (deze wordt met P_{ow} of ook wel met K_{ow} aangegeven en wordt bepaald met de HPLC-methode overeenkomstig A.8);
- c. hydrolyse;
- d. fotochemische omzetting in water onder invloed van natuurlijk of gesimuleerd zonlicht alsmede in de belichtingsomstandigheden waaronder ook de bioconcentratietest zal worden uitgevoerd (3);
- e. oppervlaktespanning (namelijk voor stoffen waarbij $\log P_{ow}$ niet kan worden bepaald);
- f. dampspanning;
- g. biologische afbreekbaarheid (voorzover relevant).

Eveneens vereist zijn gegevens over de toxiciteit van de teststof voor de in de test gebruikte vissoort, bij voorkeur in de vorm van de symbiotische (tijdonafhankelijk) LC_{50} . Er dient een passende analytische methode, met bekende nauwkeurigheid, precisie en gevoeligheid, voor de kwantitatieve bepaling van de teststof in de testoplossingen en in het biologisch materiaal beschikbaar te zijn, evenals een protocol voor de toebereiding en de opslag van de monsters. De analytische aantoonbaarheidsgrens van de teststof, zowel in water als in visweefsel, dient eveneens bekend te zijn. Wanneer een met ^{14}C gemerkte teststof wordt gebruikt, moet bekend zijn welk percentage van de radioactiviteit met onzuiverheden is geassocieerd.

1.5. Geldigheid van de test

Voor een valide test moet aan de volgende voorwaarden worden voldaan:

- de temperatuurschommelingen dienen kleiner te zijn dan ± 2 °C;
- de concentratie van de opgeloste zuurstof mag nooit minder bedragen dan 60 % van het verzadigingsniveau;
- de concentratie van de teststof in de bakken is gedurende de opnamefase nooit meer dan 20 % hoger of lager dan het gemiddelde van de gemeten waarden;
- de sterfte en de incidentie van andere ongunstige factoren (ziekte) dienen aan het einde van de test

zowel in de behandelde groep als in de controlegroep minder dan 10 % te bedragen; indien de test gedurende

verscheidene weken of maanden wordt voortgezet, mogen de sterfte en de incidentie van andere ongunstige factoren in elk van beide groepen vissen niet meer bedragen dan 5 % per maand en 30 % in het totaal.

1.6. Referentiestoffen

Het gebruik van referentiestoffen waarvan het bioconcentratiegedrag bekend is, kan in sommige gevallen nuttig zijn om de experimentele procedure te toetsen. Vooralsnog kunnen evenwel geen specifieke stoffen worden aanbevolen.

1.7. Beschrijving van de testmethode

1.7.1. Apparatuur

Voor alle onderdelen van de installatie moet het gebruik van materialen die oplossen of sorberen, waardoor stoffen in het water worden vrijgegeven of waardoor enig ander schadelijk effect op de vissen kan worden veroorzaakt, zoveel mogelijk worden vermeden. Er kunnen normale, uit een chemisch inert materiaal vervaardigde rechthoekige of cilindervormige bakken worden gebruikt die voldoende ruimte bieden, gegeven de beoogde populatiedichtheid (aantal vissen per liter water). Het gebruik van slangen uit zacht plastic moet zoveel mogelijk worden vermeden. Bij voorkeur dienen verbindingbuizen van teflon (R), roestvrij staal en/of glas te worden gebruikt. De ervaring wijst uit dat het voor stoffen met een hoge adsorptiecoëfficiënt, zoals synthetische pyretroïden, noodzakelijk kan zijn gesilaniseerd glas te gebruiken. In een dergelijk geval moet de apparatuur na gebruik worden verwijderd (geen hergebruik).

1.7.2. Water

Voor de test wordt normaliter water van natuurlijke oorsprong gebruikt dat wordt verkregen uit een niet-verontreinigde bron van uniforme kwaliteit. Het voor de verdunningen gebruikte water moet zodanig zijn dat de gekozen vissoort daarin gedurende de acclimatisatie en de looptijd van de test kan overleven zonder dat de specimens een abnormaal aspect of gedrag gaan vertonen. In het ideale geval wordt aangetoond dat de gekozen vissoort in het verdunningswater kan overleven, groeien en zich voortplanten (bijvoorbeeld in een laboratoriumkweek of in een toxiciteitstest die de hele levenscyclus omvat). Van het water moeten ten minste de pH, de hardheid, het totaalgehalte aan vaste stof en het totaalgehalte aan organische koolstof worden bepaald, alsmede, zo mogelijk, het ammonium- en nitrietgehalte en de alkaliniteit en, voor mariene soorten, het zoutgehalte. De parameters die belangrijk zijn voor het optimale welzijn van de vissen zijn genoegzaam bekend; niettemin worden in aanhangsel 1 aanbevelingen gedaan wat betreft de maximumconcentratie van een aantal stoffen in het voor de tests gebruikte zoet en zeewater.

Het water dient gedurende de test een constante kwaliteit te vertonen. De pH-waarde dient in het interval 6,0-8,5 te liggen en mag bovendien in de loop van de test met niet meer dan $\pm 0,5$ pH-eenheden schommelen. Om te garanderen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexatie van de teststof) en geen ongunstige invloed heeft op de conditie van de vissen, moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden en totaalgehalte aan organochloor-pesticiden) en het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld om de drie maanden worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Indien is aangetoond dat de waterkwaliteit op een schaal van ten minste één jaar constant blijft, zijn minder frequente

Het natuurlijke gehalte aan zwevende deeltjes en het totaalgehalte aan organische koolstof (TOC) van het

verdunningswater dienen zo laag mogelijk te zijn om te vermijden dat de teststof aan het organisch materiaal adsorbeert waardoor de biologische beschikbaarheid ervan zou afnemen (4). De maximale toelaatbare concentraties bedragen 5 mg/l voor deeltjes (droge stof, achterblijvend op een 0,45 µm filter) en 2 mg/l voor het totaal aan organische koolstof (zie aanhangsel 1). Desnoods moet het water vóór gebruik worden gefilterd. De bijdrage van de proefdieren zelf (excrementen) en van de voedselresiduen aan de hoeveelheid organische koolstof in het water dient zo klein mogelijk te worden gehouden. Gedurende de hele duur van de test mag het gehalte aan organische koolstof in de proefbakken, afgezien van de koolstof in de teststof zelf en, in voorkomend geval, het agens dat de oplosbaarheid daarvan dient te verhogen, niet meer bedragen dan 10 mg/l ($\pm 20\%$).

1.7.3. Testoplossingen

Er wordt een stockoplossing met een passende concentratie van de teststof klaargemaakt. De stockoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater. Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen (oplosbaarheidsbevorderende agentia) verdient geen aanbeveling; niettemin kan dit in bepaalde gevallen nodig zijn om een stockoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Als oplosmiddelen mogen ethanol, methanol, ethyleenglycol-monomethylether, ethyleenglycol-dimethylether, demethylformamide en triëthyleenglycol worden gebruikt. Als dispergeermiddelen mogen Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose en HCO-40 worden gebruikt. Wanneer biologisch gemakkelijk afbreekbare stoffen worden gebruikt, moet in het bijzonder worden gewaakt voor problemen die zich als gevolg van bacteriegroei in het doorstroomsysteem kunnen voordoen. De teststof mag radioactief worden gemerkt en dient de hoogste zuiverheidsgraad (bij voorkeur meer dan 98 %) te bezitten.

Voor doorstroomtests is een systeem vereist dat de stockoplossing van de teststof continu verdeelt en verdunt en ervoor zorgt dat in de bakken met de proefdieren de gewenste testconcentratie wordt gehandhaafd (bijvoorbeeld doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning, saturatorsysteem). Een verversingssnelheid van ten minste vijf bakvolumes per dag voor iedere proefbak is wenselijk. Het gebruik van een doorstroomsysteem is verkieslijk, maar als dit niet mogelijk is (bijvoorbeeld omdat de gebruikte proefdieren daarvan schade ondervinden) mag een semi-statisch systeem worden gebruikt op voorwaarde dat aan de validiteitscriteria wordt voldaan. De stroomsnelheid van de stockoplossingen en het verdunningswater moet 48 uur vóór het begin van de test en vervolgens (gedurende de test) ten minste eenmaal per dag worden gecontroleerd. Deze controle omvat eveneens de bepaling van de stroomsnelheid door iedere proefbak afzonderlijk; er moet op worden toegezien dat de verschillen, zowel per bak als tussen de bakken onderling, niet meer dan 20 % bedragen.

1.7.4. Keuze van de vissoort

Belangrijke criteria bij de keuze van de soort zijn dat zij gemakkelijk verkrijgbaar is, dat exemplaren van de geschikte grootte beschikbaar zijn en dat de soort op een bevredigende manier in het laboratorium kan worden gehouden. Andere keuzecriteria zijn het recreatieve, commerciële of ecologische belang van de soort alsmede haar relatieve gevoeligheid, het succes waarmee zij in het verleden is gebruikt enz. In aanhangsel 2 wordt een aantal aanbevolen soorten opgesomd. Ook ander soorten mogen worden gebruikt, maar in dat geval kan het nodig zijn de testprocedure aan te passen om geschikte proefomstandigheden te creëren. In dit geval moeten de redenen waarom de soort

1.7.5. Leefomstandigheden van de vissen

Laat het visbestand gedurende ten minste twee weken acclimatiseren in water dat de temperatuur heeft waarbij

de test zal worden uitgevoerd; verschaft continu voldoende voedsel van hetzelfde type als datgene dat bij de test zal worden gebruikt. Na een aanpassingsperiode van 48 uur wordt de sterfte geregistreerd en worden de volgende criteria toegepast:

- sterfte groter dan 10 % van de populatie in zeven dagen: de hele partij wordt afgekeurd;
- de sterfte bedraagt 5 tot 10 % van de populatie in zeven dagen: verdere acclimatisatie gedurende zeven dagen;
- de sterfte bedraagt minder dan 5 % van de populatie in zeven dagen: de partij wordt geaccepteerd, maar achteraf alsnog afgekeurd indien gedurende de volgende periode van zeven dagen meer dan 5 % sterfte optreedt.

Zie erop toe dat de voor de test gebruikte vissen geen zichtbare ziektekenen of abnormaliteiten vertonen. Verwijder alle zieke vissen. De vissen mogen niet tegen ziekten worden behandeld gedurende de test of gedurende de twee weken die daaraan voorafgaan.

1.8. Uitvoering van de test

1.8.1. Verkennende test

Het verdient aanbeveling een verkennende proef uit te voeren om de proefomstandigheden bij de definitieve test (bijvoorbeeld teststofconcentraties, duur van de opname- en de depuratiefase) te optimaliseren.

1.8.2. Blootstellingsomstandigheden

1.8.2.1. Duur van de opnamefase

De duur van de opnamefase kan worden geschat op basis van bestaande praktijkervaring (bijvoorbeeld gegevens uit een eerdere studie of kennis van de accumulatiesnelheid van een verwante chemische stof) of op basis van bepaalde empirische relaties, stoelend op gegevens betreffende de oplosbaarheid in water of de octanol-water-partitiecoëfficiënt van de teststof (zie aanhangsel 3).

De opnamefase dient 28 dagen te duren, tenzij kan worden aangetoond dat reeds eerder een evenwicht wordt bereikt. Indien de stationaire toestand (dynamisch evenwicht) na 28 dagen nog niet is bereikt, moet de opnamefase met 60 dagen worden verlengd, tenzij de stationaire toestand eerder wordt bereikt; gedurende de hele voortzetting van de opnamefase worden ook de metingen voortgezet.

1.8.2.2. Duur van de depuratiefase

Een tijd die half zo lang is als de opnamefase is meestal voldoende voor een adequate reductie (bijvoorbeeld met 95 %) van de lichaamsconcentratie van de teststof (zie aanhangsel 3 voor een verklaring van deze raming). Indien de tijd die nodig is voor een vermindering met 95 % in de praktijk te lang is (bijvoorbeeld indien de depuratiefase dan meer dan twee keer zo lang als de normale duur van de opnamefase, dus meer dan 56 dagen, zou duren) mag een kortere periode worden gebruikt (bijvoorbeeld tot de concentratie van de teststof minder dan 10 % van de concentratie in de stationaire toestand bedraagt). Voor stoffen met een ingewikkelder opname- en depuratiepatroon dan kan worden beschreven met een ééncompartimentmodel dat een eersteordekinetiek vertoont, moet evenwel toch in een langere depuratiefase worden voorzien met het oog op de bepaling van de eliminatiesnelheidsconstanten. De duur van de depuratiefase kan in voorkomend geval overigens mee worden beperkt door de tijd dat de concentratie van de teststof in de vissen boven de analytische aantoonbaarheidsgrens blijft.

1.8.2.3. Aantal proefdieren

Kies het aantal vissen per testconcentratie zo dat bij iedere bemonstering ten minste vier vissen per monster beschikbaar zijn. Indien een groter statistisch onderscheidingsvermogen is vereist, dienen meer vissen per monster te worden gebruikt.

Als volwassen vissen worden gebruikt, moet worden gerapporteerd of mannelijke of vrouwelijke exemplaren, dan wel beide, werden gebruikt. In dit laatste geval moet voor het begin van de blootstelling worden aangetoond dat er tussen beide geslachten qua vetgehalte geen significant verschil bestaat. Het kan noodzakelijk zijn alle mannelijke en alle vrouwelijke exemplaren samen te voegen.

Voor elke test moeten vissen met een min of meer uniform lichaamsgewicht worden gebruikt: het gewicht van de kleinste vis mag niet minder bedragen dan twee derde van dat van de grootste. Alle vissen moeten tot dezelfde jaarklasse behoren en dezelfde oorsprong hebben. Aangezien het gewicht en de leeftijd van een vis soms een significant effect op de BCF lijken te hebben (1), moeten deze gegevens nauwkeurig worden geregistreerd. Het verdient aanbeveling vóór de test een steekproef uit het vissenbestand te wegen om een schatting van het gemiddelde gewicht te verkrijgen.

1.8.2.4. Aantal vissen per liter

Gebruik een grote water/visverhouding om de vermindering van C_w door de introductie van de vissen bij het begin van de test zo klein mogelijk te houden en een afname van het gehalte aan opgeloste zuurstof te vermijden. Van belang is ook dat de dichtheid van de vissen op de biologische kenmerken van de gekozen soort wordt afgestemd. De aanbevolen dichtheid bedraagt normaliter 0,1-1,0 gram vis (versgewicht) per liter water per dag. Een grotere dichtheid is toelaatbaar als wordt aangetoond dat de schommelingen van de concentratie van de teststof de ± 20 %-grenzen niet overschrijden en het gehalte aan opgeloste zuurstof nooit minder bedraagt dan 60 % van het verzadigingspunt.

Bij de keuze van de geschikte vissendichtheid dient rekening te worden gehouden met de normale biotoop van de betrokken vissoort. Zo kunnen demersale vissen bij eenzelfde watervolume in het aquarium een grotere bodemoppervlakte verlangen dan pelagische soorten.

1.8.2.5. Voeding

Gedurende de acclimatisatie- en de testperiode wordt de vissen geschikt voer met een bekend vet- en totaal eiwitgehalte verstrekt in een voldoende hoeveelheid om ze gezond te houden en hun lichaamsgewicht op peil te houden. De vissen krijgen gedurende de acclimatisatie- en de testperiode dagelijks ongeveer 1 à 2 % van hun lichaamsgewicht te eten; bij een dergelijk regime blijft het vetgehalte bij de meeste vissoorten min of meer constant gedurende de test. De hoeveelheid voer moet bijvoorbeeld eens per week worden herberekend teneinde het lichaamsgewicht en het vetgehalte constant te houden. Voor die berekening kan het gewicht van de in iedere testbak overblijvende vissen worden geschat aan de hand van het gewicht van de vissen in de laatste uit die testbak getrokken steekproef. Het gewicht van de achterblijvende vissen zelf wordt niet bepaald.

Niet opgegeten voer en uitwerpselen worden dagelijks, korte tijd (30 minuten tot 1 uur) na de voeding, met behulp van een hevel uit de testbakken verwijderd. Die bakken worden in de loop van de test zo schoon mogelijk gehouden om de concentratie van organische stoffen zo laag mogelijk te houden, aangezien de aanwezigheid van organische koolstof de biologische beschikbaarheid van de teststof negatief kan beïnvloeden

(1).

Aangezien vele visvoerders uit vismeel worden vervaardigd, moet het voeder op de aanwezigheid van de teststof worden onderzocht. Het verdient ook aanbeveling het voeder op de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen en zware metalen te onderzoeken.

1.8.2.6. Licht en temperatuur

De belichtingsperiode belooft meestal 12 à 16 uur en de temperatuur (± 2 °C) dient geschikt te zijn voor de gebruikte vissoort (zie aanhangsel 2). Het type belichting en de karakteristieken daarvan dienen bekend te zijn. Er dient rekening te worden gehouden met de mogelijkheid dat de teststof bij de gebruikte belichting fotochemisch in andere stoffen wordt omgezet. Door een passende belichting moet worden vermeden dat de vissen aan onnatuurlijke fotochemische omzettingen worden blootgesteld. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn de UV-straling met een golflengte van minder dan 290 nm weg te filteren.

1.8.2.7. Testconcentraties

Er worden vissen blootgesteld aan ten minste twee concentraties van de teststof in doorstromend water. Normaliter wordt de hoogste concentratie van teststof zo gekozen dat zij ongeveer 1 % bedraagt van de acute asymptotische LC₅₀ en ten minste tien keer zo hoog is als de aantoonbaarheidsgrens van de stof in water voor de gebruikte analysemethode. De hoogste testconcentratie kan ook worden bepaald door de acute 96h-LC₅₀ te delen door een passende omzettingcoëfficiënt (de verhouding tussen de acuut letale en de chronisch letale concentratie, die voor diverse chemische stoffen kan variëren tussen ongeveer 3 en 100). Kies zo mogelijk de andere concentratie(s) zo dat zij een factor tien van elkaar verschillen. Indien dit in het licht van de andere criteria ("1 % van LC₅₀" en "boven de analytische aantoonbaarheidsgrens") niet mogelijk is, kan een kleinere meetkundige reden worden gekozen of kan het gebruik van een met ¹⁴C gemerkte teststof worden overwogen. Gebruik geen concentraties die hoger zijn dan die van de verzadigde oplossing.

Wanneer een oplosbaarheidsbevorderend agens wordt gebruikt, mag de concentratie daarvan niet meer bedragen dan 0,1 ml per liter en dient deze dezelfde te zijn in alle testbakken. De bijdrage van agens en teststof samen aan het totale organischekoolstofgehalte in het water in de testbakken moet bekend zijn. Het gebruik van dergelijke agentia moet hoe dan ook tot elke prijs worden vermeden.

1.8.2.8. Controles

Naast de experimentele reeksen dient een controlegroep te worden behandeld met het verdunningswater of, in voorkomend geval, met dat water en het oplosbaarheidsbevorderend agens, voorzover vaststaat dat dat agens geen effect heeft op de vissen. Zoniet zijn beide controlebehandelingen noodzakelijk.

1.8.3. Frequentie van de metingen van de waterkwaliteit

In de loop van de test moeten het gehalte aan opgeloste zuurstof, TOC, pH en temperatuur in alle bakken worden gemeten. De totale hardheid en, voorzover relevant, het zoutgehalte moeten worden gemeten in de bakken met de controlegroepen en in een bak met de hoogste teststofconcentratie. De zuurstofconcentratie en, voorzover relevant, het zoutgehalte moeten ten minste drie keer worden gemeten tijdens de opnamefase - aan het begin, omstreeks het midden en aan het einde van die fase - en vervolgens om de week gedurende de depuratiefase. De TOC moet worden bepaald bij het begin van de opnamefase (24 uur en 48 uur vóór de

vissen in de bakken worden geïntroduceerd) en vervolgens ten minste wekelijks, zowel gedurende de opname- als gedurende de depuratiefase. De temperatuur moet dagelijks worden gemeten, de pH aan het begin en aan het einde van elke periode en de hardheid eenmaal in de loop van de test. Het is wenselijk de temperatuur in ten minste één bak continu te registreren.

1.8.4. Bemonstering en analyse van de vissen en het water

1.8.4.1. Bemonsteringsschema voor vissen en water

Met het oog op de bepaling van de teststofconcentratie wordt het water in de testbakken bemonsterd vóór de vissen worden geïntroduceerd en voorts zowel gedurende de opname- als gedurende de depuratiefase. Het water moet ten minste even vaak als en tegelijk met de vissen worden bemonsterd, en wel vóór de voeding. Gedurende de opnamefase wordt de concentratie van de teststof bepaald om te controleren of aan de validiteitscriteria wordt voldaan.

De vissen worden ten minste vijfmaal in de loop van de opnamefase en ten minste viermaal in de loop van de depuratiefase bemonsterd. Omdat het in bepaalde gevallen moeilijk is op basis van dit aantal monsters een voldoende precieze schatting van de BCF-waarde te berekenen, met name wanneer er aanwijzingen bestaan dat een andere dan een simpele eersteorde-depuratiekinetiek wordt gevolgd, is het raadzaam gedurende beide periodes een hogere bemonsteringsfrequentie aan te houden (zie aanhangsel 4). De extra monsters worden bewaard en worden slechts geanalyseerd indien de resultaten van de eerste reeks analyses niet blijken te volstaan om de BCF met de gewenste precisie te berekenen.

Aanhangsel 4 bevat een voorbeeld van een goed bemonsteringsschema. Uitgaande van andere hypothetische P_{ow} -waarden ter bepaling van de blootstellingstijd die nodig is voor 95 % opname, kunnen probleemloos andere bemonsteringsschema's worden doorgerekend.

De bemonstering wordt tijdens de opnamefase voortgezet. Die fase duurt 28 dagen, tenzij zich eerder een stationaire toestand instelt. Indien na 28 dagen nog geen stationaire toestand is bereikt, wordt de bemonstering gedurende 60 dagen voortgezet tenzij zich eerder een stationaire toestand instelt. Voor de start van de depuratiefase worden de vissen naar schone bakken overgebracht.

1.8.4.2. Monsterneming en voorbereiding van de monsters

De te analyseren watermonsters worden bijvoorbeeld verkregen door afheveling uit het midden van de testbak met behulp van een slang uit inert materiaal. Aangezien kennelijk noch filtratie, noch centrifugatie in alle omstandigheden een volledige scheiding van de biologisch beschikbare en de biologisch niet-beschikbare fractie van de teststof garanderen (met name niet voor superlipofiele stoffen, d.w.z. stoffen met een $\log P_{ow} > 5$)

In plaats daarvan moeten maatregelen worden getroffen om de bakken zo schoon mogelijk te houden en moet het TOC-gehalte zowel gedurende de opnamefase als gedurende de depuratiefase bestendig worden gecontroleerd.

Bij iedere bemonstering wordt een adequaat aantal vissen (meestal ten minste vier) uit de testbakken verwijderd, kortstondig met water gespoeld, door afbetten "gedroogd", onverwijd op de meest geschikte en humane manier gedood en gewogen.

Het verdient de voorkeur de vissen en het water onmiddellijk na de monsterneming te analyseren om

afbraakprocessen en andere verliezen te vermijden. Bovendien kunnen op deze wijze naargelang de test vordert een benaderde opname- en depuratiesnelheid worden berekend. Indien de analyse meteen wordt uitgevoerd, wordt ook vermeden dat te veel tijd voorbijgaat alvorens het bereiken van het plateau wordt geconstateerd.

Indien de analyse niet onmiddellijk wordt uitgevoerd, worden de monsters in geschikte omstandigheden opgeslagen. In dit geval moeten, vooraleer de studie wordt aangevat, gegevens worden vergaard over de geschikte wijze van bewaring voor de teststof in kwestie - bijvoorbeeld diepvriezen of bewaren bij 4 °C, duur van de opslag, wijze van extractie enz.

1.8.4.3. Kwaliteit van de analysemethode

Aangezien de nauwkeurigheid, de precisie en de gevoeligheid van de analysemethode ten aanzien van de teststof bepalend zijn voor de kwaliteit van de hele procedure, moet experimenteel worden gecontroleerd of de precisie en de reproduceerbaarheid van de chemische analyse alsmede de terugvinding van de teststof in de water- en vismonsters bevredigend zijn voor de gekozen methode. Vergewis u eveneens van het feit dat geen teststof aantoonbaar is in het verdunningswater.

Zo nodig worden bij de test gemeten C_w - en C_f -waarden gecorrigeerd aan de hand van de terugvinding en de nuleffectmetingen bij de controlegroep(en). De vis- en watermonsters worden consequent behandeld op zodanige wijze dat contaminatie en verliezen (bijvoorbeeld als gevolg aan adsorptie aan de bemonsteringsapparatuur) zoveel mogelijk wordt vermeden.

1.8.4.4. Analyse van de vismonsters

Indien in de test radioactief gemerkt materiaal wordt gebruikt, kan hetzij de totale hoeveelheid radioactiviteit (d.w.z. in de oorspronkelijke stof én de metabolieten daarvan) worden gedoseerd, hetzij een zuivering worden uitgevoerd waardoor de oorspronkelijke stof afzonderlijk kan worden geanalyseerd. Ook kunnen de belangrijkste metabolieten worden gekarakteriseerd wanneer de stationaire toestand is bereikt c.q. aan het einde van de opnamefase (al naar gelang van wat zich het eerst voordoet). Indien de BCF, gemeten op basis van de totale hoeveelheid radioactief gemerkte residuen, ≥ 1000 % is, is het raadzaam - en voor bepaalde categorieën chemische stoffen zoals bestrijdingsmiddelen ten stelligste aan te bevelen - de afbraakproducten die in de stationaire toestand ≥ 10 % van de totale hoeveelheid residuen in het visweefsel vertegenwoordigen, te identificeren en te kwantificeren. Indien de afbraakproducten die 10 % of meer van de totale hoeveelheid radioactief gemerkte residuen in het visweefsel vertegenwoordigen, worden geïdentificeerd en gekwantificeerd, verdient het aanbeveling de afbraakproducten in de geanalyseerde watermonsters op dezelfde wijze uit te splitsen.

De concentratie van de teststof dient normaliter voor iedere gewogen vis afzonderlijk te worden bepaald. Als zulks niet mogelijk is, mogen de gelijktijdig genomen vismonsters worden samengevoegd, maar een dergelijke samenvoeging houdt restricties in voor de statistische procedures die op de gegevens kunnen worden toegepast. Indien het belangrijk is dat een specifieke statistische procedure kan worden toegepast of een bepaald statistisch onderscheidingsvermogen wordt gehaald, moet de test, rekening houdend met die samenvoegingsprocedure en dat onderscheidingsvermogen, met een adequaat aantal proefdieren worden uitgevoerd (6) (7).

De BCF moet worden berekend in relatie tot het totale versgewicht en, voor zeer lipofiele stoffen, ook in relatie tot de vetfractie. Het vetgehalte van de vissen wordt zo mogelijk bij iedere bemonstering bepaald. Voor de

bepaling van het vetgehalte moeten passende methoden worden gebruikt (zie de referenties 8 en 2 van aanhangsel 3). De chloroform/methanol-extractietechniek kan als standaardmethode worden aanbevolen (9). De verschillende methoden geven verschillende resultaten (10). Derhalve is het van belang dat bijzonderheden over de gebruikte methode worden verstrekt. De bepaling van het vet moet, als het kan, worden uitgevoerd op hetzelfde extract als datgene dat voor de bepaling van de teststof wordt gebruikt - de vetten moeten immers meestal toch worden verwijderd alvorens het extract chromatografisch kan worden geanalyseerd. Het vetgehalte van de vissen (in mg per kg versgewicht) behoort aan het einde van het experiment niet meer dan 25 % meer of minder te bedragen dan bij het begin. Het drogestofgehalte van het weefsel (in %) moet ook worden gerapporteerd met het oog op een mogelijke omrekening van het vetgehalte in termen van vers- respectievelijk drooggewicht.

2. GEGEVENS

2.1. Verwerking van de resultaten

De opnamecurve van de teststof wordt verkregen door de concentratie in/op de vissen (of bepaalde weefsels daarvan) in de opnamefase uit te zetten tegen de tijd in een lineair coördinatenstelsel. Als de curve een plateau bereikt, d.w.z. asymptotisch evenwijdig gaat lopen met de tijd, wordt BCF_{SS} berekend als:

$$\frac{C_f \text{ in stationaire toestand (gemiddeld)}}{C_w \text{ in stationaire toestand (gemiddeld)}}$$

Als geen stationaire situatie wordt bereikt, kan niettemin BCF_{SS} met een voor de risico-evaluatie afdoende precisie worden berekend uit een benaderde "stationaire toestand" bij 80 % ($1,6/k_2$) of 95 % ($3,0/k_2$) van de evenwichtswaarde.

De kinetische concentratiefactor BCF_k wordt berekend als de verhouding k_1/k_2 van de twee eersteordesnelheidsconstanten. De depuratiesnelheidsconstante (k_2) wordt meestal bepaald op de depuratiecurve, dit is de grafiek van de afname van de teststofconcentratie in de vissen in de loop van de tijd. De opnamesnelheidsconstante (k_1) wordt dan berekend uit k_2 en een waarde voor C_f die wordt gehaald uit de opnamecurve (zie ook aanhangsel 5). Het verdient de voorkeur KCF_k en de snelheidsconstanten k_1 en k_2 te berekenen met behulp van een gecomputeriseerde niet-lineaire parameterschattingstechniek (11). Is dit onmogelijk, dan kunnen k_1 en k_2 grafisch worden bepaald. Indien de depuratiecurve duidelijk geen eersteordekinetiek vertoont, moeten complexere modellen worden gebruikt (zie de referenties in aanhangsel 3) en moet het advies van een biostatisticus worden ingewonnen.

2.2. Interpretatie van de resultaten

De resultaten moeten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd als de gemeten concentraties van de teststofoplossingen in de buurt liggen van de analytische aantoonbaarheidsgrens.

Bioconcentratiegegevens van goede kwaliteit resulteren in scherp afgetekende opname- en eliminatiecurven. Het verschil tussen de waarden voor de opname- respectievelijk de depuratieconstante als bepaald voor de twee testconcentraties behoort niet meer te bedragen dan 20 %. Indien tussen de gemeten waarden van de opname- c.q. de depuratiesnelheidsconstante voor de twee gebruikte testconcentraties een significant verschil bestaat, moet dit worden genoteerd en moeten mogelijk verklaringen worden gesuggereerd. Bij goed opgezette studies is het betrouwbaarheidsinterval voor de BCF in het algemeen niet veel ruimer dan (puntschatting) ± 20

%.

3. RAPPORTAGE

In het verslag over de test moeten de volgende gegevens worden opgenomen:

3.1. Teststof:

- voorkomen en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen;
- chemische karakteristieken (eventueel met inbegrip van het organischekoolstofgehalte);
- indien radioactief gemerkt materiaal wordt gebruikt, de precieze positie van het radioactieve atoom (de radioactieve atomen) en het percentage van de radioactiviteit dat met onzuiverheden is geassocieerd.

3.2. Proefdiersoort:

- wetenschappelijke naam, stam, oorsprong, eventuele voorafgaande behandeling, acclimatisatie, leeftijd, grootte-interval enz.

3.3. Proefomstandigheden:

- gebruikte testprocedure (bijvoorbeeld doorstroomsysteem of semi-statisch systeem);
- aard en kenmerken van de gebruikte verlichting en lichtregime (L:D);
- proefopzet (bijvoorbeeld aantal en grootte van de testbakken, verversingssnelheid van het water, aantal replicaties, aantal vissen per replicatie, aantal testconcentraties, duur van de opname- en de depuratiefase, frequentie van de bemonstering van vissen en water);
- wijze waarop de stockoplossingen worden bereid en vervangingsfrequentie (indien een oplosbaarheidsbevorderend agens wordt gebruikt, moeten de aard, de concentratie en de bijdrage daarvan tot het organischekoolstofgehalte van het water in de testbakken worden vermeld);
- de nominale testconcentraties, de gemiddelden en standaardafwijkingen van de desbetreffende in de testbakken gemeten waarden en de methode waarmee zij zijn bepaald;
- de oorsprong van het verdunningswater, een beschrijving van de eventuele voorafgaande behandeling daarvan, de resultaten van eventuele proeven betreffende het vermogen van de proefdieren om in dat water te overleven en de kenmerken van dat water: pH, hardheid, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, residueel chloorgehalte (indien bepaald), totale hoeveelheid organische koolstof (TOC) en zwevende deeltjes, zoutgehalte van het proefmedium (voorzover relevant), alsmede de resultaten van eventuele andere bepalingen;
- waterkwaliteit in de testbakken, pH, hardheid, TOC, temperatuur en gehalte aan opgeloste zuurstof;
- nadere gegevens over het voer (bijvoorbeeld aard, herkomst, samenstelling - zo mogelijk ten minste het vet- en het eiwitgehalte -, voederfrequentie en -hoeveelheid);
- gegevens over de behandeling van de vis- en watermonsters, met inbegrip van bijzonderheden over de voorbereiding, de opslag, de extractie en de procedures (met inbegrip van de precisie daarvan) voor de analytische bepaling van de teststof en, in voorkomend geval, het vetgehalte.

3.4. Resultaten:

- resultaten van eventuele voorbereidende experimenten;
- sterfte van de vissen in de controlegroep(en) en de vissen in iedere proefbak, alsmede eventuele

waarnemingen van abnormaal gedrag;

- het vetgehalte van de vissen (indien dit ter gelegenheid van de bemonstering werd bepaald); - grafieken van het verloop van de opname (inclusief het bereiken van de stationaire toestand) en de depuratie van de teststof door de vissen (met een weergave van alle meetwaarden);
- C_f en C_w (met standaardafwijking en, desgewenst, bereik) voor ieder bemonsteringstijdstip. C_f wordt uitgedrukt in μg per gram versgewicht (ppm) van het lichaam als geheel of van bepaalde weefsels, bijvoorbeeld het vetweefsel, en C_w in lg per ml (ppm). De C_w -waarden voor de controlegroepen en de nuleffectmetingen dienen eveneens te worden gerapporteerd;
- de bioconcentratiefactor in stationaire situatie (BCF_{SS}) en/of de kinetische bioconcentratiefactor (BCF_K) alsmede, in voorkomend geval, de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen voor de opname- en de depuratie- (eliminatie-)snelheidsconstante, alle berekend in relatie tot het totale lichaamsgewicht c.q. de totale vetfractie (in voorkomend geval) van het dier of van nader omschreven weefsels. Voor iedere beproefde concentratie van de teststof moeten de gemiddelden, betrouwbaarheidsintervallen en standaardafwijkingen (voorzover bekend) worden gerapporteerd. Geef aan welke gegevensverwerkings- en rekenmethoden werden gebruikt;
- indien radioactief gemerkt materiaal werd gebruikt en voorzover daartoe aanleiding bestaat: gegevens over de eventuele accumulatie van metabolieten;
- alle ongewone verschijnselen die zich in de loop van de test hebben voorgedaan, alle afwijkingen
- van voornoemde procedures en alle andere relevante gegevens.

Aangezien metingen die resulteren in de conclusie "niet aantoonbaar bij de gegeven aantoonbaarheidsgrens" onbruikbaar zijn voor het berekenen van de snelheidsconstanten, moet door aanpassingen van de proefopzet in het licht van de gegevens van voorbereidende experimenten dat type uitkomst zoveel mogelijk worden vermeden.

4. REFERENTIES

1. Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp 117-156.
2. Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, 29-390.
3. OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No 3.
4. Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
5. US EPA 822-R-94-002 (1994). Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. For the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
6. US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
7. US EPA (1974). Section 5, A(1). Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
8. Compaan H. (1980) in `The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation', Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands.
9. Gardner et al. (1995). Limn. & Oceanogr. 30, 1099-1105.
10. Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid

methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Envir. Chem.* 10, pp 1431-1436.

11. CEC. Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.
12. ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988). Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

Voor vragen en/of opmerkingen over EMIS kunt u mailen naar emis@vito.be

Copyright © [VITO](http://www.vito.be) 04/12/1998

Ontwerp [EMIS](http://www.emis.vito.be).