

~~~~~

***Ecotoxiciteitstests: algengroei-inhibitietest***

~~~~~

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	3
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	4
4.1	APPARATUUR:	4
4.2	TESTORGANISMEN	4
5	REAGENTIA EN OPLOSSINGEN	5
5.1	GROEIMEDIUM (VERDUNNINGSMEDIUM).....	5
5.2	TESTOPLOSSINGEN	5
6	PROCEDURE	6
6.1	BLOOTSTELLINGSCONDITIES	6
6.2	TESTUITVOERING	7
7	KWALITEITSCONTROLE	8
7.1	TIJDENS DE TEST.....	8
7.2	EERSTELIJNSCONTROLE.....	8
8	BEREKENINGEN & RAPPORTERING	8
8.1	BEREKENINGEN	8
8.2	RAPPORTAGE.....	10
9	REFERENTIES	11

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze methode is geschikt om de acute en chronische toxiciteit voor eencellige *algen* te bepalen van:

- Chemische stoffen die in water oplosbaar zijn onder de testcondities of die in een stabiele suspensie of dispersie blijven onder de testcondities.
- Diverse watermatrices: afval-, oppervlakte-, drink-, grondwater, ef-/influent, absorptievloeistoffen, uitloogfracties, extracten, waterige oplossing,...

Deze bepaling is een onderdeel van de ecotoxicologische beoordeling van (afval)waters en chemische stoffen in water, namelijk de meting van de toxiciteit voor het trofische niveau van primaire producenten.

De test kan als een chronische test worden beschouwd omdat de generatietijd korter is dan de blootstellingsduur.

Er zijn 3 versies van de test toegelaten:

- a) klassiek protocol zoals beschreven in OECD 201 en ISO 8692 – test in erlenmeyers. Deze mag worden toegepast op zuivere producten en omgevingsstalen.
- b) de snelle screeningstest zoals beschreven in ISO 8692-annex 1 – test in 48 well platen. Deze kan gebruikt worden voor testen op omgevingsstalen en voor screening van chemische stoffen.
- c) Algaltookit®; testkit waarmee screeningstesten kunnen worden uitgevoerd. Deze kan gebruikt worden voor testen op omgevingsstalen en zuivere producten.

2 PRINCIPE

Ref: OECD 201, ISO 8692

Exponentieel groeiende culturen van eencellige groene algen worden blootgesteld aan een concentratiereeks van de teststof gedurende verschillende generaties (72h), in gestandaardiseerde omstandigheden. De groei van een algensoort is de som van een aantal cellulaire en metabole processen. Het effect van een voor algen schadelijk staal/product vertaalt zich in een verlaagde toename van de biomassa en verminderde groeisnelheid. De inhibitie van de groei en groeisnelheid in verhouding tot een controlecultuur wordt gemeten op welbepaalde tijdstippen (elke 24h) gedurende de test.

Het oorspronkelijk inoculum bevat een beperkt aantal cellen (5000-15000 cellen/ml), die tijdens de blootstellingsduur kunnen uitgroeien wanneer er zich in het medium geen inhiberende stoffen bevinden. In controle-omstandigheden zal het aantal cellen dan ook exponentieel toenemen (zijnde een constante groeisnelheid).. Wanneer het te testen staal stoffen bevat die toxisch zijn voor algen, dan zal de groei verminderen en de groeisnelheid dalen. De inhibitie wordt berekend enerzijds voor de toename in biomassa (procentueel tov de biomassa in de controles). Anderzijds wordt de inhibitie van de groeisnelheid berekend (procentueel tov de groeisnelheid in de controles).

3 OPMERKINGEN

Volgende definities zijn van toepassing:

- *Biomassa* is de hoeveelheid biologisch materiaal per volume, in dit geval uitgedrukt in celconcentratie (eventueel omgerekend vanuit of uitgedrukt in een equivalent signaal)
- *Biomassa equivalent*: wanneer de celconcentratie niet rechtstreeks gemeten wordt, maar via fluorescentie, dan kan het fluorescentiesignaal als *biomassa equivalent signaal* worden beschouwd.
- *celconcentratie* is het aantal cellen per ml
- *groei* is de toename van de biomassa gedurende de testperiode
- *groeisnelheid* is de toename van de celconcentratie per tijdseenheid.
- *EC(x)* is in deze methode die concentratie teststof die leidt tot een afname met x% van hetzij de opbrengst (EbC(X)), hetzij de groeisnelheid (ErC(X)) ten opzichte van de controle.
- *NOEC* (No Observed Effect Concentration) is in deze methode de hoogste in de test gebruikte concentratie waarbij de gemeten parameter geen statistisch significante remming van de groei(snelheid) ten opzichte van de controle aangeeft.
- *LOEC* (Lowest Observed Effect Concentration) is in deze methode de laagste in de test gebruikte concentratie waarbij de gemeten parameter een statistisch significante remming van de groei(snelheid) ten opzichte van de controle aangeeft.

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 Apparatuur:

- Standaard labo-uitrusting
- Algenincubator of geklimatiseerde kamer met verlichting
- Microscoop
- Steriele werkbank
- Coulter counter of fluorometer
- pH meter
- conductiviteitsmeter
- methode voor ammoniumbepaling
- 250 ml erlenmeyers (steriel door autoclavieren) met luchtdoorlatende stoppen
- of
- 48 well platen
- of
- Testkits Algaltoxkit

4.2 Testorganismen

Men gebruikt om praktische redenen bij voorkeur snelgroeiende soorten van eencellige groene algen.

O.a. volgende algensoorten zijn geschikt voor gebruik bij eco-toxicologische testen:

NAAM	CODE (CCAP)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	11/45
<i>Chlorella vulgaris</i>	211/11B
<i>Selenastrum capricornutum*</i> syn <i>Raphidocelis subcapitata</i> nu <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	278/4

Scenedesmus subspicatus

276/20

* deze soort geniet de voorkeur. Deze soort is ook het testorganisme dat in de Algaltoxkit wordt gebruikt.

Er mogen andere soorten gebruikt worden. Noteer steeds duidelijk op het testverslag welke soort gebruikt werd.

De organismen kunnen in het labo in kweek worden gehouden, of men kan gebruik maken van testkits met dormante organismen die in kweek worden gebracht voor de uitvoering van de test.

Voor algen in kweek: gebruik voor de test algen waarvan de laatste passage 3-4 dagen voor de start van de test is gebeurd.

De gewenste startconcentratie algen is ~10.000 cellen/ml (minimum 5000, maximum 15000 cellen / ml). Om dit te bereiken maakt men vlak voor de start bv.10 ml 1000x geconcentreerde algenstock (met 10E7 cellen/ml). De stock moet voldoende geconcentreerd zijn om geen grote verdunning van de teststof te hebben bij toevoeging van algensuspensie.

5 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

5.1 Groeimedium (verdunningsmedium)

De Algaltoxkit® bevat de nodige componenten om de media aan te maken. Volg de handleiding.

Voor de erlenmeyertest en 48 well plaat test: de media beschreven in OECD 201 <http://puck.sourceoecd.org/vl=480978/cl=13/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n2/s2/p1.idx> en ISO 8692 zijn geschikt voor de uitvoering van de algentest.

5.2 Testoplossingen

Eventueel het monster steriliseren door filtratie over 0.22 µ, om autochtone algenspecies te verwijderen en bacteriële interferentie met de algengroei te vermijden.

Randvoorwaarden meten: meet de pH in alle testverdunningen.

(voor waterstalen is het ook belangrijk de conductiviteit, het ammoniumgehalte, chloriden en de hardheid van het oorspronkelijke staal te meten).

De toegelaten ranges voor deze parameters staan hieronder vermeld. Bij overschrijding van deze voorwaarden kunnen effecten op de groei verwacht worden. Overschrijdingen moeten duidelijk in het rapport vermeld worden.

Testorganisme	pH	geleidbh. (µS/cm)	hardheid (mg CaCO ₃ /l)	chloride (mg/l)	ammonium (mg/l bij pH 8) ¹
Algen	7.0 – 9.0	< 4000	< 1000	< 1300	< 25

¹: dissociatie NH₄⁺/NH₃ is belangrijk, hetgeen bepaald wordt door pH en temperatuur. In deze tabel wordt pH 8 als referentie gebruikt, maar men moet er rekening mee houden dat de toxiciteit bij pH-waarden lager dan 8.0 afneemt en toeneemt bij hogere pH.

Bij overschrijding van pH kan de test in tweevoud worden uitgevoerd: met en zonder pH correctie.

Testconcentraties

In het ideale geval worden de testconcentraties zodanig gekozen dat de laagst geteste concentratie geen remmend effect vertoont op de groei van de algen, terwijl de hoogst geteste concentratie de groei met tenminste 50% inhibeert, bij voorkeur zelfs met 100%. Op de helling van de curve liggen idealiter de effectwaarden van 2 tot 3 testconcentraties.

Voor Waterstalen worden in eerste instantie standaardverduunningen gebruikt: 100-50-25-12.5-6.25 % van het oorspronkelijke staal. (Verduunningen in water).

Indien de EC50 in deze range ligt of > 100% wordt geen verdere test meer uitgevoerd.

Indien de EC50 waarde rond of beneden 6.25% ligt wordt een extra test uitgevoerd met ½ verduunningen in de gepaste range.

Voor chemische stoffen*: de concentratierange waarin de effecten waar te nemen zijn, wordt vooraf bepaald door middel van een *range-finding test*. In deze test worden minstens vijf concentraties getest die verdund zijn in een geometrische serie met voldoende grote verdunningsfactor (bij voorkeur een factor log10). De maximale testconcentratie is 1g/l.

Uit deze preliminaire test wordt de concentratierange voor de *finale test* afgeleid. In het ideale geval worden de concentraties zodanig gekozen dat de laagst geteste concentratie geen remmend effect vertoont op de groei van de algen, terwijl de hoogst geteste concentratie de groei met tenminste 50% inhibeert, bij voorkeur zelfs met 100%.

*Voor moeilijk oplosbare stoffen kan een solvent worden gebruikt. De eindconcentratie van het solvent in de test mag maximaal 0.1% bedragen en moet in alle verduunningen en in de controle even hoog zijn.

6 PROCEDURE

6.1 Blootstellingscondities

- Test omvat
 - abiotische controle (recipiënt met medium, zonder algen om na te gaan of het medium niet gecontamineerd is) (bij fluorometrische bepalingen: achtergrondplaat met testoplossingen zonder algen voor kleurcorrectie),
 - blanco (medium met algen)
 - solvent controle (indien van toepassing: medium met solvent + algen)
 - testverduunningen
- Er worden minstens 3 replica's gebruikt per testconcentratie en voor de blanco controlegroepen. Als abiotische controle volstaat 1 erlenmeyer.
- Instellingen:
 - temperatuur 23°C +/- 2
 - licht: continu, voldoende om een normale groei in controles te bekomen.

- Toerental: 100 rpm – continu schudden om bezinking te voorkomen.
- De blootstellingstijd bedraagt 72 uur.
- Metingen:
 - Celconcentratie
 - Erlenmeyertest: De celconcentratie kan gemeten worden met behulp van een coulter-counter met gefiltreerd algenmedium als achtergrondwaarde, of door een andere geschikte methode.
 - 48 well platen: de celconcentratie kan ingeschat worden met fluorescentiemetingen (plate reader).
 - Testkit: de celconcentratie wordt ingeschat op basis van optische dichtheidsmeting (spectrofotometrie)
 - pH
- Celconcentratie metingen gebeuren op de tijdstippen 24, 48 en 72 uur na het begin van de test.
- De pH van de testoplossingen wordt gemeten bij het begin en het einde van de test (0 en 72 h)

6.2 Testuitvoering

De testoplossingen worden onmiddellijk voor het starten van de proef bereid (maximaal 6 uur op voorhand).

OECD/ ISO methode (erlenmeyer)

- Er wordt een algenstock bereid met een celconcentratie van 10^{E+7} cellen /ml.
- De erlenmeyers worden gevuld met 5 ml medium en 95 ml teststofverduunning of water (blanco's) en geïnoculeerd met 100 µl algenstock (in erlenmeyer: 10000 cellen/ml).*
- De pH wordt gemeten in elke erlenmeyer en het aantal cellen in de controles wordt bepaald (= startaantal).
- De erlenmeyers worden *ad random* in de incubator geplaatst bij de gepaste testcondities (zie hoger).
- Na 24 uur wordt voor elke erlenmeyer het aantal cellen gemeten in een substaal. De erlenmeyers worden teruggeplaatst (*ad random*). Deze stappen worden herhaald op 48 h.
- Na 72 uur worden opnieuw voor elke erlenmeyer het aantal cellen gemeten in een substaal en wordt de pH opnieuw gemeten in elke erlenmeyer.

ISO methode (48 well platen)

- Er wordt een algenstock bereid met een celconcentratie van 10^{E+7} cellen /ml.
- De wells worden gevuld met 40 µl medium en 720 ml teststofverduunning of water (blanco's) en geïnoculeerd met 40 µl algenstock (in well: 5000 cellen/ml)*.
- Het aantal cellen wordt gemeten in equivalent-sigitaal (bv fluorescentie). Het gemiddelde sigitaal in de controles is een maat voor het startaantal of de biomassa bij de start.
- De plaat wordt in de incubator geplaatst bij de gepaste testcondities (zie hoger).
- Na 24 uur wordt opnieuw in elke well het aantal cellen gemeten via een equivalent sigitaal. De plaat wordt teruggeplaatst in de incubator. Deze stappen worden herhaald op 48 h.
- Na 72 uur wordt opnieuw in elke well het aantal cellen gemeten via een equivalent sigitaal en wordt de pH gemeten in elke well.

* deze verhoudingen laten toe hoge testconcentraties (tot 90%) van (afval)waterstalen te testen. Het medium is 20x geconcentreerd tov klassiek medium. Verdunningen van de teststof worden in water gemaakt, zodat de verhouding staal/medium in alle testconcentraties gelijk is.

Algal Toxkit® methode (Microbiotest):

Volg de handleiding die bij de kit geleverd is.

7 KWALITEITSCONTROLE

7.1 Tijdens de test

- Controleer bij voorkeur de algen microscopisch, en gebruik enkel gezonde algen voor de test.

Aanvaardingscriteria

De testresultaten kunnen enkel gebruikt worden indien aan volgende voorwaarden voldaan is:

- De biomassa in de controlecultuur moet met minstens een factor 16 zijn toegenomen tijdens de testperiode van 3 dagen.
- De variantiecoëfficiënt voor de gemiddelde specifieke groeisnelheden per dag in de controleculturen, mag niet hoger zijn dan 35%. De groeisnelheid moet dus gelijkmatig blijven (exponentiële toename van het aantal cellen in de controles).
- De variantiecoëfficiënt van de specifieke groeisnelheden voor de hele testperiode (dag 0 - > dag 3) in de replica's van de controles, mag niet hoger zijn dan 7% (voor *Pseudokirchneriella* en *Desdemona*, voor andere soorten kan 10% getolereerd worden)
- De pH van de controles mag maximaal met 1.5 eenheden verschuiven.
- Om een EC50 waarde te kunnen berekenen moet er een duidelijk concentratieafhankelijk effect zijn, zodat de EC50 afgeleid kan worden van de helling tussen twee concentraties.

7.2 Eerstelijnscontrole

- De herkomst van de organismen moet getraceerd kunnen worden.
- De (eventuele) kweek moet via een logboek opgevolgd worden.
- Een referentiestof kan met regelmatige tussenpauzen worden getest om te toetsen of de algen een normaal groeipatroon en gevoeligheid vertonen. Als referentiestof wordt bij voorkeur **kaliumdichromaat** gebruikt: $K_2Cr_2O_7$ (MW. = 294.2). Bij de Algaltoxkit® wordt voor elke batch de gevoeligheid voor deze referentiestof gemeten en gerapporteerd door de leverancier van de kits. ISO geeft als richtwaarde $ErC50 = 1.19 \text{ mg/l} \pm 0.27$.

8 BEREKENINGEN & RAPPORTERING

8.1 Berekeningen

Er worden 2 eindpunten geëvalueerd: opbrengst (biomassa) en groeisnelheid.

Biomassa (Yield, opbrengst)

De opbrengst (Y) wordt eenvoudig berekend als het verschil in biomassa equivalent (BE) op het einde van de blootstellingsduur (na 72uur) t.o.v. het begin.

$$Y_x = BE_{72h} - BE_{0h}$$

Voor elke concentratie en de controles wordt de gemiddelde opbrengst berekend en een indicatie voor de variatie (SD = standaarddeviatie, VC = variantiecoëfficiënt).

De Procentuele inhibitie in opbrengst wordt als volgt berekend:

$$\%I_{va} = (Y_c - Y_a) \times 100 / Y_c$$

waarin :

Y_c	= opbrengst in controle
Y_a	= opbrengst in concentratie a
$\%I_{va}$	= percent inhibitie van de opbrengst door concentratie a

Groeisnelheid

De gemiddelde specifieke groeisnelheid voor een specifieke periode is de logaritmische toename in biomassa: voor elke individuele beker wordt deze specifieke groeisnelheid berekend als volgt:

$$\mu_{i-j} = (\ln BE_j - \ln BE_i) / (t_j - t_i)$$

waarin: BE = biomassa equivalent
t = tijdstip van de meting (t in dagen)
i-j = tijdsperiode waarbinnen de specifieke snelheid berekend wordt

De specifieke groeisnelheid wordt gemeten voor de totale periode (0 (=i) – 3 (=j) dagen) voor elke individuele beker.

Voor deze gegevens wordt de inhibitie procentueel berekend,

$$\%I_{ra} = (\mu_c - \mu_a) \times 100 / \mu_c$$

waarin :

μ_c	= specifieke groeisnelheid in controle
μ_a	= specifieke groeisnelheid in concentratie a
$\%I_{ra}$	= percent inhibitie van de groeisnelheid door concentratie a

Daarnaast wordt ook de specifieke groeisnelheid voor elke afzonderlijke dag berekend voor elke individuele beker van de controles. De specifieke groeisnelheid in de controles moet van dag tot dag vergelijkbaar zijn (zie aanvaardingscriteria: exponentiële groeifase)

EC50 - NOEC/LOEC berekenen

- Bereken de EC50 waarden voor het tijdstip 72 uur (biomassa, groeisnelheid) via gepaste statistische methoden.
- Wanneer geen EC50 waarden berekend kunnen worden, is het nuttig NOEC en LOEC te bepalen indien mogelijk.
- Indien 2 opeenvolgende concentraties met een onderlinge verhouding van 2 reeds 0 en 100 % inhibitie geven, dan zijn deze waarden voldoende om aan te geven in welk gebied de LC₅₀ ligt. Er is geen verdere test nodig om de helling te verfijnen.
- Noteer ook de laagste concentratie die 100% effect (indien mogelijk).

8.2 Rapportage

Het rapport bevat indien mogelijk:

- Samenvatting van de resultaten
- Referentie naar het protocol dat gevolgd wordt
- Uitvoeringsdata
- Informatie over het monster
 - herkomst, code, aard, ...
 - Gemeten randvoorwaarden: indien niet voldaan moet dit duidelijk gerapporteerd worden en de mogelijke invloed op de resultaten worden aangegeven
 - Indien mocht blijken dat de stabiliteit of homogeniteit van de teststof niet kan worden gehandhaafd tijdens de test, moet dit duidelijk worden vermeld en is voorzichtigheid geboden bij de interpretatie van de resultaten.
- Informatie over de testorganismen
 - wetenschappelijke naam, leverancier, behandeling,
 - kwaliteit (uitgevoerde controles die de goede kwaliteit kunnen aantonen)
- Verantwoording testconcentraties
- Samenstelling verdunningsmedium
- Testverloop (specifieke testcondities, informatie over het meetsysteem, afwijkingen van het protocol)
- Informatie over de berekeningswijzen
- Resultaten
 - Toetsing aan de aanvaardingscriteria
 - Effectwaarden
 - Wanneer er geen effecten worden waargenomen moet men aangeven dat het staal geen toxische effecten veroorzaakt voor de testorganismen binnen de testconcentratierange en de gebruikte blootstellingstijd.
 - indien effecten worden waargenomen rapporteer waar mogelijk:
 - EC50 waarden
 - NOEC/LOEC
 - Laagste concentratie met 100%
 - Grafieken
 - % inhibitie van de biomassa in functie van de concentratie. Op basis van deze curve wordt de EbC(X) bepaald.

- % inhibitie van de groeisnelheid in functie van de concentratie. Op basis van deze curve wordt de ErC(X) bepaald.
- De groeicurven: deze geven voor de individuele concentraties de logBiomassa in functie van de tijd.
- Bespreking van de resultaten en eventuele invloeden door externe factoren/afwijkingen tijdens de test.

9 REFERENTIES

OECD guidelines for testing chemicals N° 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (2006)

ISO 8692 (2004): Water quality: freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae