

Ecotoxiciteitstest: Overlevingstest op watervlo (*Daphnia magna*)

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	3
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	4
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
4.2	<i>Infrastructuur</i>	4
4.3	<i>Materiaal</i>	4
5	REAGENTIA en OPLOSSINGEN	5
5.1	<i>Verdunningswater</i>	5
5.2	<i>Referentiestof</i>	5
5.3	<i>Oplossingen</i>	5
6	PROCEDURE	6
6.1	<i>Voorafgaande acties</i>	6
6.2	<i>Monstervoorbereiding en metingen</i>	7
6.3	<i>Testuitvoering</i>	7
7	KWALITEITSCONTROLE	8
8	BEREKENING van de EC₅₀ waarde (test op verdunningsreeks)	9
9	RAPPORTERING	9
10	REFERENTIES	10

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze methode is geschikt om de acute toxiciteit voor *Daphnia magna* te bepalen van:

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

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 de kleine invertebrata.

Er zijn 2 versies van de test toegelaten:

- a) klassiek protocol zoals beschreven in OECD 201 en ISO 8692 – test in bekens.
- b) Daphtoxkit®; testkit waarmee de acute daphniatest kan worden uitgevoerd.

2 PRINCIPE

De acute toxiciteitstest op de watervlo *Daphnia magna* berust op het meten van het aantal immobiele organismen na 24 en na 48 uur blootstelling aan (een verdunningsreeks van) een waterige oplossing of monster. De test heeft tot doel om de eventuele acute schadelijkheid van het staal voor deze organismen te meten (en eventueel te kwantificeren). De effecten worden uitgedrukt in termen van **% effect in de limiettest met 100% afvalwater of EC50 voor immobilisatie indien een verdunningsreeks wordt getest**. Eventueel kunnen voor testen op verdunningsreeksen ook NOEC en LOEC vermeld worden, en de laagste concentratie die 100% effect veroorzaakt, en het effect dat in de hoogste testconcentratie wordt waargenomen.

De test **op een verdunningsreeks** kan in 2 fasen worden uitgevoerd:

- a) een preliminaire test waarbij de effectrange wordt bepaald via grove verdunningen (bv. log 10)
- b) een finale test waarbij binnen de effectrange verfijnde verdunningen worden gebruikt (bv. log 2)

3 OPMERKINGEN

Volgende definities zijn van toepassing:

- *Immobiele dieren*: dieren die niet in staat zijn om, nadat het testvat zachtjes wordt bewogen, te zwemmen.
- *EC50* (50 % effectconcentratie): dit is de concentratie waardoor 50% van de daphnia's in een testgroep wordt geïmmobiliseerd binnen de vooraf bepaalde blootstellingsperiode.
- *NOEC* (no observed effect concentration): dit is de hoogste testconcentratie die GEEN statistisch significante immobilisatie veroorzaakt in vergelijking met de controle groep.

- *LOEC* (lowest observed effect concentration) : dit is de laagste testconcentratie die WEL statistisch significante immobilisatie veroorzaakt in vergelijking met de controle groep.
- *Referentiestof*: een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de gevoeligheid van de geteste soort onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate veranderd is.

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

Gangbare laboratoriumapparatuur.

4.1 APPARATUUR

- Zuurstofmeter
- Thermometer
- pH-meter
- Uitrusting voor de bepaling van de hardheid van het water
- Weegschaal

4.2 INFRASTRUCTUUR

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

4.3 MATERIAAL

Materiaal dat rechtstreeks in contact komt met de testoplossingen is bij voorkeur geheel van glas.
Testbekers: glazen potten met een inhoud van 50 ml, met losse deksels **of de blootstellingsrecipiënten geleverd bij de testkit.**

Organismen: *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*)

Bij eigen kweek:

De daphnia's moeten gedurende minstens 3 generaties in het laboratorium gekweekt zijn via acyclische parthenogenese in welomschreven testcondities, vrij van zichtbare ziekten, zonder wintereieren en met een bekende geschiedenis (bv. voorbehandelingen ...) die gedocumenteerd wordt in een logboek.

De organismen die in de test gebruikt worden, worden allemaal uit dezelfde cultuur gerecrueteerd en zijn maximaal 24 uur oud bij de start van de blootstelling.

Bij gebruik van testkits:

De organismen worden ontloken uit ephippia (rusteieren) en de test wordt uitgevoerd met net ontloken organismen (< 24 h).

5 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

5.1 VERDUNNINGSWATER

Elk water, zowel natuurlijk als synthetisch water, dat geschikt is voor de teelt van daphnia's kan voor de aanmaak van verdunningen worden gebruikt. De voorkeur wordt echter gegeven aan gecontroleerd synthetisch medium bv. JP4 medium (beschreven in de OECD richtlijn 202).

Bij gebruik van de testkit: de ingrediënten voor het mineraal medium worden bij de testkit geleverd.

Randvoorwaarden voor het verdunningswater zijn:

- pH: 7.8 ± 0.2
- hardheid: $250 \text{ mg/l} \pm 25$ (uitgedrukt als CaCO_3)
- Ca/Mg ratio ongeveer 4/1
- Opgeloste zuurstof: $> 7 \text{ mg/l O}_2$

Bij eigen kweek: tenminste 3 weken vóór de test wordt in de kweekcompartimenten hetzelfde medium gebruikt als tijdens de test.

5.2 REFERENTIESTOF

Kaliumbichromaat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (analytical grade)
of ZnCl_2

5.3 OPLOSSINGEN

De verdunningen worden kort voor het begin van de test bereid (max. 6 uur voor de start).

Voor zuivere stoffen:

- Er wordt een stockoplossing met de gewenste concentratie aangemaakt door de te testen stof op te lossen of te mengen in ultra puur water. Stockoplossingen van slecht in water oplosbare stoffen kunnen worden bereid door ultrasone dispersie of, zo nodig, met gebruik van organische oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen. De uiteindelijke concentratie in de test van dergelijke hulpstoffen is bij voorkeur niet hoger dan $0,1 \text{ mg/l}$.
- De gekozen testconcentraties worden bereid door de stockoplossing te verdunnen (diluties) met verdunningswater dat op voorhand belucht werd en op kamertemperatuur is ($18\text{-}22^\circ\text{C}$).
- De concentraties voor de preliminaire test zijn meestal log 10 verdunningen met een maximale concentratie 1 g/l . In de finale test wordt meestal een verdunningsfactor 2 gebruikt. De concentratiereeks voor de finale test wordt gekozen op basis van de resultaten van de preliminaire test zodat (bij voorkeur) na 24 uur een immobilisatie van 0 % in de laagste en 100 % in de hoogste testconcentratie voorkomt. Via een reeks tussenliggende concentraties (bij voorkeur minstens 3) kan de EC50-waarde na 24 en/of 48 uur voldoende nauwkeurig berekend worden.
- Naast de verdunningsreeks wordt een controletest (= medium zonder teststof = blanco controle) meegenomen in de test. Indien hulpstoffen worden gebruikt moet, naast de blanco-controle, ook een solventcontrole mee getest worden (= medium met hulpstof, maar zonder teststof. De concentratie hulpstof = hoogste concentratie die in de test gebruikt wordt. Bij voorkeur wordt deze zelfde concentratie in alle testrecipiënten gebruikt).

Voor afvalwaters:

De stalen steeds bewaren in het donker **bij 4°C in de koelkast**. De testen worden bij voorkeur opgestart binnen 48 uur na staalname (ISO11348), maar een marge tot 4 dagen wordt om praktische redenen getolereerd, op voorwaarde dat het staal correct bewaard wordt. Indien de test pas later kan uitgevoerd worden is het toegelaten het afvalwaterstaal in te vriezen ($\leq -18^{\circ}\text{C}$). Vermeld wel steeds de datums van aankomst en van testuitvoering in het rapport, en de bewaarcondities.

Testuitvoering:

LIMIETTEST

Er worden enkel replica's van controles en 100% afvalwater in de test gebruikt.

VERDUNNINGSREEKS

- De gewenste verdunningen worden aangemaakt in verdunningswater. Standaard wordt een test op waterstalen uitgevoerd op de volgende concentraties: 100- 75 – 50 – 25 - 12.5 % afvalwater. Indien de resultaten van deze reeks toelaten om een EC50 waarde **na 48 uur** vast te leggen (i.e. wanneer er 3 testconcentraties op de helling van de concentratie-effectcurve liggen) of wanneer de 100% concentratie geen effect teweegbrengt, is er geen vervolgtest nodig. Is dit niet het geval dan wordt een tweede (finale) test uitgevoerd met verdunningen in de effectrange. De concentraties worden zodanig gekozen dat zij (bij voorkeur) **na 48 uur** een immobilisatie van 0 % in de laagste en het maximale effect in de hoogste testconcentratie voorkomt. Via een reeks tussenliggende concentraties (bij voorkeur minstens 3) kan de EC50-waarde na 24 en/of 48 uur berekend worden.
- Als blancocontrole wordt dilutiewater gebruikt.
- Indien extractieprocedures op het oorspronkelijke staal worden uitgevoerd, wordt dilutiewater op identieke wijze behandeld en wordt dit behandelde dilutiewater als methode-controle meegetest om de eventueel door de behandeling geïntroduceerde toxiciteit te meten.

ALGEMEEN

- Meet na de bereiding zowel in de controles als in de testoplossingen de pH en het zuurstofgehalte.
- De test dient normaliter te worden uitgevoerd zonder correctie van de pH. Indien de pH sterk schommelt of verandert tijdens de test, wordt geadviseerd om de test te herhalen met gecorrigeerde pH en ook deze resultaten in het rapport te vermelden.
- **Voor zuivere stoffen** wordt bij voorkeur de pH-waarde van de stockoplossing aangepast en gelijk gemaakt aan de pH-waarde van het medium met HCl of NaOH. Deze pH-correctie moet zodanig gebeuren dat de concentratie van de teststof in de stockoplossing niet in belangrijke mate wordt gewijzigd. Indien tengevolge van de correctie toch een chemische reactie of fysische neerslag van de teststof mocht optreden, dan dient dit expliciet te worden vermeld in het rapport.

6 PROCEDURE

6.1 VOORAFGAANDE ACTIES

- Eigen kweek: daags (maximaal 24 uur) voor het opstarten van de eigenlijke test worden in minstens één kweekcompartiment de volwassen individuen afgezonderd en de jongen verwijderd (via zeven die de jongen doorlaten en de ouderorganismen tegenhouden). De

jongen die dan op de startdag in het compartiment zwemmen, zijn neonaten van maximaal 24 uur oud die geschikt zijn voor gebruik in de test.

- Testkits: volg de handleiding om de organismen tijdig te laten ontluiken.
- De volgende gegevens **worden bij voorkeur** op de laboformulieren vermeld worden: studienummer, referentienummer van het monster, species informatie (batch nummer), aantal organismen per concentratie en per recipient, hoeveelheid testoplossing per organisme, aantal replica's, tijdsduur van de test, type van medium, lichtcyclus en vooropgestelde temperatuur.

6.2 MONSTERVEROEBEREIDING EN METINGEN

De monsterveroebereiding is afhankelijk van het type water of stof dat getest moet worden. Eventueel zijn extracties mogelijk.

Randvoorwaarden meten: meet zuurstof en pH in alle testverduningen.

(voor waterstalen is het ook belangrijk de conductiviteit, ammoniumgehalte en chloriden van het oorspronkelijke staal te meten). De toegelaten ranges voor deze parameters staan hieronder vermeld. Bij overschrijding van deze voorwaarden kunnen effecten op de mobiliteit verwacht worden. Overschrijdingen moeten duidelijk in het rapport vermeld worden.

Testorganisme	pH	Zuurstof (mg/l)	geleidbh. ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	chloride (mg/l)	ammonium (mg/l bij pH 8)
Daphnia	5.0 – 9.0	> 3	< 7500	< 1300	< 54

- Eventueel wordt de pH aangepast (zie hoger).
- Eventueel wordt het staal gefilterd indien de invloed van zwevend deeltjes niet wordt mee geëvalueerd.
- Eventueel wordt het staal belucht indien het zuurstofgehalte lager is dan 7 mg/l.
- Verduningen worden bereid zoals boven aangegeven.

6.3 TESTUITVOERING

Blootstellingscondities:

De *blootstellingsduur* bedraagt **ten minste 24 uur en maximum** 48 uur.

ALGEMEEN

De testrecipienten worden tijdens de test losjes afgesloten met een ~~plastic~~ doorzichtig deksel. Indien echter de teststof vluchtig is, wordt de testcontainer **zorgvuldig** afgesloten met een goed afsluitend deksel.

Licht-donker cyclus 16h/8h licht/donker of in volledige duisternis.

De *testtemperatuur* van het medium moet tussen 18° en 22°C liggen; voor iedere afzonderlijke test **mag** de temperatuur bij voorkeur maximaal met 2,0 °C schommelen.

De temperatuur wordt 1 maal per dag gemeten in een meetrecipient – met vergelijkbare afmetingen dan de testrecipienten - dat dilutiemedium bevat en op dezelfde locatie staat dan de testrecipienten.

De testoplossingen worden *niet belucht* tijdens de test, tenzij het zuurstofgehalte tijdens de test beneden 40% daalt.

De dieren worden *niet gevoederd* tijdens de test.

Testuitvoering**LIMIETTEST op afvalwaters**

- gebruik 6 replica's voor controle en 100% afvalwater
- meet zuurstofgehalte, pH en conductiviteit.
- noteer de meetresultaten en de behandelingen.
- collecteer de organismen (< 24 h oud)
- vul 6 blootstellingskamers met controlemedium, 6 met 100% afvalwater
- noteer startdatum en -uur.
- controleer de mobiliteit van de daphnia's na 24 en 48 uur en meet telkens de temperatuur in het meetrecipient. Noteer beide parameters.
- op het einde van de test worden pH en zuurstofconcentratie gemeten in minstens 1 replica van elk, en genoteerd. Indien deze parameters sterk verlopen zijn moet overwogen worden om de test te herhalen met aangepaste pH of met beluchting.
- verwijder de dieren en de oplossingen als chemisch afval.

VERDUNNINGSREEKS

- Tenminste 20 dieren worden getest in iedere concentratie, bij voorkeur in 4 groepen van 5 dieren (=4 replica's). Voor de controle worden bij voorkeur 6 replica's van telkens 5 organismen gebruikt.
- Voor ieder dier dient tenminste 2 ml testoplossing aanwezig te zijn, bij voorkeur 4 ml/organisme. Maak de nodige verdunningen en meet in elke verdunning zuurstofgehalte, pH en conductiviteit. Pas eventueel de pH aan indien gewenst, belucht eventueel indien nodig (zie boven).
- Noteer de meetresultaten en de behandelingen.
- Zeef de organismen (< 24 h oud) uit de kweekbeker (zie voorafgaande acties).
- Neem het nodige aantal recipiënten en nummer ze eenduidig.
- Vul elk recipient met de controle en testvloeistoffen (bij voorkeur 6 replica's voor de controles en 4 replica's voor elke dilutie).
- Noteer startdatum en -uur, en voor elke concentratie de nummers van de recipiënten en eventuele opmerkingen.
- Controleer de mobiliteit van de daphnia's na 24 en eventueel 48 uur en meet telkens de temperatuur in het meetrecipient. Noteer beide parameters.
- Op het einde van de test worden pH en zuurstofconcentratie van de verschillende testconcentraties en controles gemeten in minstens 1 replica van elk, en genoteerd. Indien deze parameters sterk verlopen zijn moet overwogen worden om de test te herhalen met aangepaste pH of met beluchting.
- Verwijder de dieren en de oplossingen als chemisch afval.

7 KWALITEITSCONTROLE**Tijdens de test**

- De immobilisatie in de controlegroep mag aan het einde van de test niet groter zijn dan 10%.
- De zuurstofconcentratie mag aan het einde van de test niet lager zijn dan 2 mg/l.
- **Bij eigen kweek van Daphnia:** de testorganismen moeten gedurende minstens 3 generaties in het laboratorium gekweekt zijn, vrij van zichtbare ziekten en met een bekende geschiedenis (bv. voorbehandelingen ...). Er mogen geen wintereieren geproduceerd worden in de kweekbekers.

Eerstelijnscontrole

- De herkomst van de organismen moet getraceerd kunnen worden.
- Bij eigen kweek:
 - de kweek van de organismen moet via een logboek opgevolgd worden.
 - De (variaties in) gevoeligheid van de organismen moet gedocumenteerd worden via 2-3 maandelijks testen op een verdunningsreeks van een referentiestof, waarvan de EC₅₀ waarden genoteerd moeten worden in een gegevensbank. Voor Kaliumbichromaat ligt de normale EC₅₀ waarde op 24 uur tussen 0.6 en 2.1 mg/l (n = 1697; ISO).
 - De gemiddelde EC₅₀ waarde voor ZnCl₂ van de deelnemers aan de ringtest Aquacheck (n=18 testronden) is 1.82 mg/ (± 2*SD: tussen 1.16 en 2.48).
- Voor testkits zijn steeds de gegevens van een kaliumbichromaat test op de batch voorhanden. **Het labo controleert minstens 1x per jaar of de aangegeven waarde overeenkomt met de resultaten van een eigen test uitgevoerd met dezelfde batch organismen. Deze meting wordt in duplo uitgevoerd om de interne variatie in te schatten. De EC₅₀ waarden worden genoteerd in een gegevensbank.**

8 BEREKENING VAN DE EC₅₀ WAARDE (TEST OP VERDUNNINGSRREEKS)

- Het percentage immobilisatie na 24 en 48 uur wordt voor elke concentratie berekend.
- Een grafiek met het cumulatieve percentage immobilisatie in functie van de concentratie voor 24 en 48 uur blootstelling wordt gemaakt.
- De EC₅₀-waarde kan berekend worden via een gepaste statistische methode.
- Wanneer geen EC₅₀ waarde kan berekend worden (bv. omdat de hoogste concentratie minder dan 50% effect veroorzaakt), is het nuttig NOEC en LOEC te bepalen indien mogelijk.
- Wanneer er helemaal geen effecten worden waargenomen bij de gebruikte testconcentraties, moet men aangeven dat het staal geen toxische effecten veroorzaakt voor de testorganismen binnen de testconcentratierange.
- Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge concentratieverhouding van 2 respectievelijk 0 en 100% veroorzaken, is het voldoende de EC₅₀ te situeren tussen deze beide concentraties.
- Indien mocht blijken dat de stabiliteit of homogeniteit van de teststof niet kan worden gehandhaafd, dan dient dit te worden vermeld en is voorzichtigheid geboden bij de interpretatie van de resultaten.

9 RAPPORTERING**Indien relevant bevat het testrapport:**

- gegevens over het testorganisme (wetenschappelijke naam, herkomst, kweekmethode, voeding, conditie...)
- beschrijving van de testbekers, hoeveelheden oplossing, aantal gebruikte dieren, **aantal replica's**
- gebruikte concentraties en verantwoording (eventueel op basis van preliminaire test)
- alle beschikbare gegevens over de stabiliteit van de concentraties van de opgeloste teststof of het staal

- in geval van chemische analyses: toegepaste methoden en resultaten
 - herkomst van het verdunningswater alsmede de belangrijkste chemische kenmerken
 - methode voor de bereiding van de testoplossingen
 - concentratie van eventuele hulpstoffen
 - temperatuur tijdens de test (elke 24 uur minstens) en lichtregime
 - zuurstofgehalte en pH-waarden van de testoplossingen bij het begin en einde van de test
 - vermelding of aan de kwaliteitscriteria is voldaan
 - cumulatieve immobilisatie (procentueel of in absolute waarde) in de verschillende testoplossingen na 24 uur en 48 uur
 - Voor verdunningsreeksen:
 - statistische procedures voor de bepaling van de EC50-waarden, NOEC en LOEC
 - de EC50-waarde op 24 en ~~ev.~~ 48 uur (met – indien mogelijk – de 95% betrouwbaarheidsintervallen)
 - voor afvalwaters wordt eventueel EC₅₀ omgerekend naar toxische eenheden (TE)
 - grafiek van deze concentratie/respons-curve voor 24 uur en 48 uur blootstelling
 - hoogste testconcentratie die geen immobilisatie veroorzaakte (NOEC = no observed effect concentration)
 - laagste testconcentratie die een significante immobilisatie veroorzaakte (LOEC = lowest observed effect concentration)
 - effect in de hoogste testconcentratie, laagste testconcentratie die 100% effect veroorzaakt (indien van toepassing).
 - Voor afvalwaters: eventueel de interpretatie volgens het Vlaamse beoordelingskader voor afvalwaters*:
 - < 1 TE: geen acute toxiciteit
 - 1-10 TE: lage acute toxiciteit
 - 10-100 TE: acute toxiciteit
 - > 100 TE: hoge acute toxiciteit
- Vermeld duidelijk dat het resultaat enkel een beoordeling van de acute toxiciteit van het afvalwater voor *daphnia* inhoudt.
- Voor limiettesten:
 - % effect in de hoogste testconcentratie.
 - Voor afvalwaters is 100% de hoogste testconcentratie. Het afvalwater wordt als acuut toxisch beoordeeld indien het effect $\geq 50\%$ is in deze testconcentratie. De finale beoordeling van de toxicologische kwaliteit van een afvalwater is gebaseerd op het resultaat van 4 biotesten (microtox (% inhibitie van bioluminescentie na 30 min blootstelling aan 90% afvalwater), algen (% inhibitie van de groeisnelheid na 72 uur blootstelling aan 95% afvalwater), daphnia (% immobiliteit na 48 uur blootstelling aan 100% afvalwater) en forel (% sterfte na 96 uur blootstelling aan 100% afvalwater). Het resultaat van de meest gevoelige test wordt gebruikt om het afvalwater als acuut toxisch te beoordelen.

10 REFERENTIES

- ISO 6341: 1996 (E); Water Quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test.