

## Ecotoxiciteitstest: Overlevingstest op watervlo (*Daphnia magna*)

---

**INHOUD**

<b>1</b>	<b>TOEPASSINGSGEBIED</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>PRINCIPE</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>OPMERKINGEN</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>APPARATUUR EN MATERIAAL</b>	<b>4</b>
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
4.2	<i>Infrastructuur</i>	4
4.3	<i>Materiaal</i>	4
<b>5</b>	<b>REAGENTIA en OPLOSSINGEN</b>	<b>5</b>
5.1	<i>Verdunningswater</i>	5
5.2	<i>Referentiestof</i>	5
5.3	<i>Oplossingen</i>	5
<b>6</b>	<b>PROCEDURE</b>	<b>6</b>
6.1	<i>Voorafgaande acties</i>	6
6.2	<i>Monstervoorbereiding en metingen</i>	7
6.3	<i>Testuitvoering</i>	7
<b>7</b>	<b>KWALITEITSCONTROLE</b>	<b>8</b>
<b>8</b>	<b>BEREKENING van de EC<sub>50</sub> waarde (test op verdunningsreeks)</b>	<b>8</b>
<b>9</b>	<b>RAPPORTERING</b>	<b>9</b>
<b>10</b>	<b>REFERENTIES</b>	<b>10</b>

## 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 bekertjes.
- b) Daphtoxkit®; testkit waarmee de acute daphniatest kan worden uitgevoerd.

De test kan worden uitgevoerd op een verdunningsreeks wanneer het doel is om de effectwaarden voor de concentratie-effectrelatie te bepalen. De test kan ook als limiettest worden uitgevoerd indien enkel de ernst van het effect bij een vooropgestelde concentratie moet beoordeeld worden.

Voor de beoordeling van afvalwaters wordt een limiettest op 100% afvalwater uitgevoerd.

## 2 PRINCIPE

De acute toxiciteitstest op de watervlo *Daphnia magna* berust op het meten van het aantal mobiele 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 monster voor deze organismen te meten (en eventueel te kwantificeren). De effecten worden uitgedrukt in termen van:

- % effect in de limiettest met 100% afvalwater na 48 h of;
- Effectwaarden voor immobilisatie na 48 h indien een verdunningsreeks wordt getest: EC<sub>50</sub>, en eventueel kunnen voor testen op verdunningsreeksen ook NOEC en LOEC vermeld worden, 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.
- **Limiettest: in de test worden enkel controles en 1 testconcentratie gebruikt.**
- *EC<sub>50</sub>* (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/nachtritme en regelbare temperatuur.

### 4.3 MATERIAAL

*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 gerecruteerd 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. Volg de instructies.

Randvoorwaarden voor het verdunningswater zijn:

- pH:  $7.8 \pm 0.2$
- hardheid:  $250 \text{ mg/l} \pm 25$  (uitgedrukt als  $\text{CaCO}_3$ )
- 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

Zinkchloride ( $\text{ZnCl}_2$ )

### 5.3 OPLOSSINGEN

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

Voor zuivere stoffen (referentiestof):

- Er wordt een stockoplossing met de gewenste concentratie aangemaakt door de te testen stof op te lossen of te mengen in ultra puur water. {}
- 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  $1\text{g/l}$ . 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 48 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  $\text{EC}_{50}$ -waarde na 48 uur voldoende nauwkeurig berekend worden.
- Naast de verdunningsreeks wordt een controleconditie (= medium zonder teststof = blanco controle) meegenomen in de test. {}

Voor afvalwaters:

De stalen steeds bewaren in het donker in de koelkast ( $1\text{-}5^\circ\text{C}$ ). 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 op afvalwater

Er worden enkel controles (verdunningsmedium) en 100% afvalwater getest. Indien de conductiviteit dit niet toelaat wordt de test uitgevoerd met een zoutwaterorganisme (*Artemia*).

VERDUNNINGSREEKS

- De gewenste verdunningen worden aangemaakt in verdunningswater. Standaard wordt een test op afvalwaters uitgevoerd op de volgende concentraties: 100- 50 – 25 - 12.5 – 6.25 % 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 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.
- Bij het testen van extracten in solvent (bij voorkeur DMSO) wordt eerst de verdunningsreeks in solvent aangemaakt en daarna worden deze verdunningen aan 0.1% getest.

ALGEMEEN

- Meet na de bereiding zowel in de controles als in de testoplossingen de pH en het zuurstofgehalte (zie onder § 6.2).
- 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.

}

## 6 PROCEDURE

### 6.1 VOORAFGAANDE ACTIES

- Eigen kweek van Daphnia: daags (maximaal 24 uur) voor het opstarten van de eigenlijke test worden in minstens één kweekcompartiment (met voeding) de volwassen individuen afgezonderd door de jongen te verwijderen (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.

## 6.2 MONSTERVOORBEREIDING EN METINGEN

De monstervoorbereiding is afhankelijk van het type water of stof dat getest moet worden. Eventueel kunnen fracties geëxtraheerd worden.

Randvoorwaarden meten: meet zuurstof en pH in alle testverduningen.

Voor (afval)waterstalen is het ook belangrijk de conductiviteit, het ammoniumgehalte en de 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. (μS/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 **3 mg/l**.
- **Indien het zoutgehalte te hoog is wordt de test op Artemia (zoutwaterorganisme) uitgevoerd.**
- **Indien het ammoniumgehalte te hoog is kan via striptechieken ammonium worden verwijderd.**
- Verdunningen worden bereid zoals boven aangegeven (zie §5.3).

Noteer de meetresultaten en de behandelingen.

## 6.3 TESTUITVOERING

### **Blootstellingscondities:**

De *blootstellingsduur* bedraagt **48 uur**.

- De testrecipiënten 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 °C schommelen.
- De testoplossingen worden *niet belucht* tijdens de test, tenzij het zuurstofgehalte tijdens de test beneden **3 mg/l** daalt.
- Voor ieder dier wordt tenminste **2 ml testoplossing** voorzien {}.
- De dieren worden *niet gevoederd* tijdens de test.

### **Testuitvoering**

#### **ALGEMEEN**

- Collecteer het nodige aantal organismen (< 24 h oud) en breng ze in de recipiënten.
- meet op het einde van de test pH en zuurstofconcentratie in elke conditie en noteer. Indien deze parameters sterk verlopen zijn moet overwogen worden om de test te herhalen met aangepaste pH of met beluchting.
- verwijder de organismen en de oplossingen als chemisch afval.

**LIMIETTEST**

- gebruik **minstens 4** replica's met elk 5 organismen voor de controles en voor de geplande concentratie afvalwater (10-20 ml/replica)
- noteer de mobiliteit van de daphnia's na **48 uur**

**VERDUNNINGSREEKS**

- Tenminste 20 dieren worden getest in elke concentratie, bij voorkeur in 4 groepen van 5 dieren (=4 replica's). {}
- Neem het nodige aantal recipiënten en nummer ze eenduidig.
- Vul elk recipiënt met de controle- en testvloeistoffen (10-20ml).
- Controleer de mobiliteit van de daphnia's na 24 en 48 uur en meet telkens de temperatuur in het meetrecipiënt. Noteer beide parameters.

De volgende gegevens worden op de laboformulieren vermeld: studienummer, referentienummer van het monster, speciesinformatie (batchnummer), aantal organismen per concentratie en per recipiënt, hoeveelheid testoplossing per organisme of per recipiënt, aantal replica's, startdatum en -uur, tijdsduur van de test, type van medium, lichtcyclus en temperatuur, pH en zuurstofgehalte bij begin en eind van de test, conductiviteit van de oplossingen.

## 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.

**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 EC<sub>50</sub> waarden genoteerd moeten worden in een gegevensbank.
    - De gemiddelde EC<sub>50</sub> waarde voor ZnCl<sub>2</sub> op 48 uur ligt tussen 1.16 en 2.48 mg/l (n=18 Aquacheck testronden, gemiddelde waarde van de 18 gemiddelden voor deelnemende labo's ±2\*SD)
- Voor testkits zijn steeds de gegevens van een kaliumbichromaattest op de specifieke batch voorhanden.
- **Minstens 1x per jaar deelnemen aan een externe ringtest.**

## 8 BEREKENING VAN DE EC<sub>50</sub> WAARDE (TEST OP VERDUNNINGSREEKS)

- Het percentage immobilisatie na 24 en 48 uur wordt voor elke conditie berekend.
- Een grafiek met het cumulatieve percentage immobiliteit in functie van de concentratie voor 24 en 48 uur blootstelling wordt opgesteld.
- De EC<sub>50</sub>-waarde kan berekend worden via een gepaste statistische methode.



- Wanneer geen EC<sub>50</sub> 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
- {}
- verdunningswater {}
- methode voor de bereiding van de testoplossingen
- {}
- temperatuur tijdens de test {} 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 {} 48 uur
- Voor verdunningsreeksen:
  - statistische procedures voor de bepaling van de EC50-waarde, ~~NOEC en LOEC~~
  - de EC50-waarde op {} 48 uur (met – indien mogelijk – de 95% betrouwbaarheidsintervallen)
- {}
- grafiek van deze concentratie/respons-curve voor 24 uur en 48 uur blootstelling
- {}
- effect in de hoogste testconcentratie, laagste testconcentratie die 100% effect veroorzaakt (indien van toepassing).
- Voor limiettesten:
  - % effect in de hoogste testconcentratie na 48 h.
  - Voor afvalwaters is 100% de hoogste testconcentratie. Het afvalwater wordt als acuut toxisch beoordeeld indien het effect > 50% is na 24h in deze testconcentratie.
  - **Indien de conductiviteit van het afvalwater te hoog is wordt de test op Artemia uitgevoerd (testkit).**

(De finale beoordeling van de toxicologische kwaliteit van een afvalwater is gebaseerd op het resultaat van de gevoeligste van de 4 biotesten (microtox (% inhibitie van bioluminescentie na 30 min blootstelling aan 100% 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 de acute toxiciteit van het afvalwater 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.