

Ecotoxiciteitstests: algengroei-inhibitietest

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	4
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	4
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
4.2	<i>Testorganismen</i>	5
5	REAGENTIA EN OPLOSSINGEN	5
5.1	<i>Groeimedium (verdunningsmedium)</i>	5
5.2	<i>Testoplossingen</i>	5
6	PROCEDURE	7
6.1	<i>Blootstellingscondities</i>	7
6.2	<i>Testuitvoering</i>	7
7	KWALITEITSCONTROLE	8
7.1	<i>Tijdens de test</i>	8
7.2	<i>Eerstelijnscontrole</i>	8
8	BEREKENINGEN & rapportering	8
8.1	<i>Berekeningen</i>	8
8.2	<i>Rapportage</i>	10
9	REFERENTIES	11

1 TOEPASSINGSGBIED

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, uitloofracties, 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) Algaltokit®; testkit waarmee screeningstesten kunnen worden uitgevoerd. Deze kan gebruikt worden voor testen op omgevingsstalen en zuivere producten.

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 afvalwaters wordt de limiettest uitgevoerd met >95% afvalwater.

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 (48 - 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 monster/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 {} van de groeisnelheid wordt berekend (procentueel t.o.v. de groeisnelheid in de controles).

De effecten worden uitgedrukt in termen van:

- % effect in de limiettest met >95% afvalwater na 72 h of;
- Effectwaarden voor inhibitie van de groeisnelheid na 72h indien een verdunningsreeks wordt getest: EC_{50} , 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:

- *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
- *limiettest: in de test worden enkel controle en 1 testconcentratie gebruikt.*
- *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/en fluorometer
- pH meter

- conductiviteitsmeter
- methode voor ammoniumbepaling
- 250 ml erlenmeyers (steriel door autoclaveren) met luchtdoorlatende stoppen
- of
- 48 well platen
- of
- Testkits Algaltokit

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>Selenastrum capricornutum</i> *	
syn <i>Raphidocelis subcapitata</i>	
nu <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	278/4

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.

Voor Algaltokit®: volg de handleiding.

5 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

5.1 GROEIMEDIUM (VERDUNNINGSMEDIUM)

De Algaltokit® 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 en ISO 8692 zijn geschikt voor de uitvoering van de algentest.

5.2 TESTOPLOSSINGEN

Afvalwaters:

De stalen steeds bewaren in het donker in de koelkast (1-5°C). De testen worden bij voorkeur opgestart binnen 48 h 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.

Eventueel het monster steriliseren door filtratie over $0.22\ \mu$, om autochtone algensoorten te verwijderen en bacteriële interferentie met de algengroei te vermijden.

Randvoorwaarden meten: meet de pH in alle testverduunningen.

Voor (afval)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. ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	hardheid (mg CaCO_3/l)	chloride (mg/l)	ammonium (mg/l bij pH 8)
Algen	7.0 – 9.0	< 4000	< 1000	< 1300	< 25

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

Bij overschrijding van de conductiviteit wordt de test uitgevoerd met zoutwateralgen (*Phaeodactylum capricornutum*).

Testconcentraties

LIMIETTEST

Voor de beoordeling van afvalwaters wordt een limiettest uitgevoerd. Aan het afvalwater wordt geconcentreerd medium toegevoegd (nutriënten voor de algen tijdens de test). Daardoor is de maximale testconcentratie voor afvalwater 95 - 98,5% voor respectievelijk erlenmeyertesten en testkits. Indien de conductiviteit te hoog is, wordt de test uitgevoerd met een zoutwaterorganisme (*Phaeodactylum tricornutum*: testkit).

VERDUNNINGSREEKS

Indien E_rC_{50} waarden moeten worden bepaald wordt de test op een verdunningsreeks uitgevoerd.

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 E_rC_{50} in deze range ligt of $> 100\%$ wordt geen verdere test meer uitgevoerd.

Indien de E_rC_{50} waarde rond of beneden 6.25% ligt wordt een extra test uitgevoerd met $\frac{1}{2}$ verduunningen in de gepaste range.

Voor de referentiestof: 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 verduunningsfactor (bij voorkeur een factor \log_{10}). 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 groeisnelheid van de algen, terwijl de hoogst geteste concentratie de groeisnelheid met tenminste 50% inhibeert, bij voorkeur zelfs met 100%.

}

6 PROCEDURE

6.1 BLOOTSTELLINGSCONDITIONS

ALGEMEEN

- Temperatuur: 20°C +/- 2
- Licht: continu, voldoende om een normale groei in controles te bekomen.
- Toerental: 100 rpm – continu schudden om bezinking te voorkomen.
- De pH van de testoplossingen wordt gemeten bij het begin en het einde van de test
- De testoplossingen worden onmiddellijk voor het starten van de proef bereid (maximaal 6 uur op voorhand).

LIMIETTEST

- De testopstelling omvat
 - Minstens 3 x blanco (medium met algen)
 - 3 x testoplossing
- Celconcentratie metingen gebeuren bij het begin van de test en 72 h 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).

VERDUNNINGSRREEKS

- De testopstelling omvat
 - Minstens 3 x blanco (medium met algen)
 - testoplossingen – minstens 3 replica's
 - eventueel solventcontroles – minstens 3 replica's
 - celconcentratie metingen gebeuren op de tijdstippen 0 en 72 h na het begin van de test.
 - Erlenmeyertest: De celconcentratie kan gemeten worden met behulp van een coulter-counter met gefiltreerd algenmedium als achtergrondwaarde, of door een andere geschikte methode.
- }
- Testkit: de celconcentratie wordt ingeschat op basis van optische dichtheidsmeting (OD) (spectrofotometrie). De testkit geeft de correlatie tussen OD en biomassa.

6.2 TESTUITVOERING

ALGEMEEN

De blootstellingsduur is 72h.

De algenconcentratie wordt gemeten bij het begin en het einde van de test.

De pH wordt gemeten in elke oplossing bij het begin en het einde van de test.

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 (20x geconcentreerd) medium en 95 ml testoplossing of zuiver water (blanco's) en geïnoculeerd met 100 µl algenstock (in erlenmeyer: 10000 cellen/ml).*
- Het aantal cellen in de controles wordt gemeten (= startaantal).
- De erlenmeyers worden *ad random* in de incubator geplaatst bij de gepaste testcondities (zie hoger).

* deze verhoudingen laten toe hoge testconcentraties (tot 95%) 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 van de specifieke groeisnelheden voor de hele testperiode (dag 0 -> dag 3) in de replica's, mag niet hoger zijn dan 7%.
- Om een EC₅₀ waarde te kunnen berekenen moet er een duidelijk concentratie-afhankelijk 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 tussenpauzes worden getest om te toetsen of de algen een normaal groeipatroon en gevoeligheid vertonen. Als referentiestof wordt ZnCl₂ gebruikt. De gemiddelde EC₅₀ waarde voor ZnCl₂ van de deelnemers aan de ringtest Aquacheck (n=18 testronden) is 0.12 mg/ (± 2*SD: tussen 0.008 en 0.238 mg/l).
- Tot nader order wordt voor de kwaliteitscontrole van de testkits de klassieke referentiestof kaliumdichromaat gebruikt: K₂Cr₂O₇ (MW. = 294.2). {} ISO geeft als richtwaarde E_rC₅₀ = 1.19 mg/l ± 0.27 voor kaliumdichromaat.
- Deelname aan een externe ringtest (minstens jaarlijks).

8 BEREKENINGEN & RAPPORTERING

8.1 BEREKENINGEN

Er worden 2 eindpunten geëvalueerd: opbrengst (biomassa) en groeisnelheid, maar enkel de parameter groeisnelheid wordt voor classificatie van afvalwaters en chemische stoffen gebruikt.



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)

LIMIETTEST

Het effect wordt in % inhibitie van de groeisnelheid in de geteste concentratie (>95%) ten opzichte van de controle uitgedrukt.

VERDUNNINGSREEKS: EC₅₀ - NOEC/LOEC berekenen

- Bereken de EC₅₀ waarden voor het tijdstip 72 uur (tenminste groeisnelheid) via gepaste statistische methoden.
- Voor algentesten is het nuttig NOEC en LOEC te bepalen indien mogelijk, omdat deze effectwaarden voor chronische effecten zijn.
- 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 EC₅₀ ligt. Er is geen verdere test nodig om de helling te verfijnen.
- Noteer ook {} het % effect dat de hoogste testconcentratie veroorzaakt.

ALGALTOXKIT: bij gebruik van de algaltoxkit, kan voor de berekeningen van de EC50 waarde gebruik gemaakt worden van de door de leverancier bijgeleverde Excel-files.

8.2 RAPPORTAGE

Het rapport bevat indien **relevant**:

- 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 {}, **batch**, 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
 - LIMIETTEST
% inhibitie ten opzichte van de controle bij blootstelling gedurende 72 h.

Voor afvalwaters is de hoogste testconcentratie $\geq 95\%$ afvalwater. Het afvalwater wordt als acuut toxisch beoordeeld indien het effect na 72h $> 50\%$ is in deze testconcentratie.

Indien de conductiviteit van het afvalwater **te hoog is, wordt de algentest uitgevoerd met de zoutwateralg *Phaeodactylum tricornutum* (testkit).**

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 **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 **72** uur blootstelling aan 100% afvalwater). Het resultaat van de meest gevoelige test wordt gebruikt om het afvalwater als acuut toxisch te beoordelen.

- VERDUNNINGSREEKS
 - 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:
 - E_rC₅₀ waarden
 - {}
 - % Effect bij de hoogste testconcentratie
 - Grafiek
 - % inhibitie van de groeisnelheid in functie van de concentratie. Op basis van deze curve wordt de E_rC_(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