

Ecotoxiciteitstest: Overlevingstest op watervlo (*Daphnia magna*)

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE VAN DE TESTEN	3
3	OPMERKINGEN	4
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	4
4.1	<i>Apparatuur</i>	5
4.2	<i>Infrastructuur</i>	5
4.3	<i>Materiaal</i>	5
5	REAGENTIA en OPLOSSINGEN	5
5.1	<i>Verdunningsmedium</i>	5
5.2	<i>Referentiestof</i>	6
5.3	<i>Oplossingen</i>	6
6	PROCEDURE	7
6.3	<i>Testuitvoering</i>	8
7	KWALITEITSCONTROLES	10
8	BEREKENING VAN DE EC50 WAARDE (test op verdunningsreeks)	10
9	RAPPORTERING	11
10	REFERENTIES	11

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze methode is geschikt om de acute toxiciteit voor *Daphnia magna* (watervlo) 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 zoetwatermatrices: afval-, oppervlakte-, drink-, grondwater, ef-/influent, absorptievloeistoffen, uitloging, waterige oplossing

{De acute test op watervlooiën wordt } gebruikt om de toxiciteit voor het trofische niveau van de primaire consumenten te meten.

Afvalwaters met een hoog zoutgehalte (> 7500 µS/cm) worden getest in de acute toxiciteitstest met *Artemia franciscana* (pekelkreeftje). Deze zoutwatertest heeft tot doel de aanwezigheid van schadelijke stoffen - die door zout gemaskeerd kunnen zijn - te detecteren. {De procedure wordt hieronder kort beschreven.

Voor de daphniatest zijn in het kader van deze WAC methode 2 versies van de test toegelaten:

- a) klassiek protocol zoals beschreven in OECD 201 (2004) en ISO 6341(2012) – test in bekertjes .
- b) Daphtoxkit f®; testkit waarmee de acute daphniatest kan worden uitgevoerd met organismen ontloken uit dormante wintereitjes.

Voor de acute test met *Artemia* is de testkit Artoxkit M® beschikbaar.

{}

2 PRINCIPE VAN DE TESTEN

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. Voor afvalwaters wordt de immobiliteit uitsluitend geëvalueerd na 48 uur.

In de test met het pekelkreeftje *Artemia franciscana* wordt het aantal immobiele organismen na 24 uur geëvalueerd.

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

Voor het meten van de toxiciteit van afvalwaters wordt een limiettest op 100% afvalwater uitgevoerd, en worden de effecten na 48 h (watervlo) en 24h (pekelkreeft) blootstelling gerapporteerd.

Voor het kwantificeren van toxiciteit en toxiciteitswijzigingen kunnen testen met verdunningsreeksen worden uitgevoerd die toelaten om de gewenste effectwaarden (ECx) te bepalen. Hiervoor wordt voor afvalwaters een ½ verdunningsreeks getest (100-50-25-12.5-6.25 %). Bij hoge toxiciteit kunnen verdere verdunningen worden getest.

{De effecten worden uitgedrukt in termen van:

- % effect in de limiettest { na 24 en/of 48 h (watervlo) en 24 h (pekelkreeft)

- Effectwaarden voor immobilisatie na 24 en/of 48 h (watervlo) en 24 h (pekelkreeft) indien een verdunningsreeks wordt getest: EC_{50} , {} laagste concentratie die 100% effect veroorzaakt, en het % effect dat in de hoogste testconcentratie wordt waargenomen.

De testen op verdunningsreeksen kunnen eventueel 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_{50} (50 % effectconcentratie): dit is de concentratie waardoor 50% van de daphnia's in een testgroep wordt geïmmobiliseerd binnen de vooraf bepaalde blootstellingsperiode.
- {}
- *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
- geleidbaarheidsmeter
- 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:

Daphniatest: glazen potten met een inhoud van 50 ml, met losse deksels of de blootstellingsrecipiënten geleverd bij de testkit.

Artemiatest: blootstellingsrecipiënten geleverd bij de testkit

Organismen:

Daphniatest: *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Branchiopoda*, *Crustacea*)

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.

Testkit:

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

Artemiatest: *Artemia franciscana* (*Anostraca*, *Branchiopoda*, *Crustacea*)

De organismen worden ontloken uit cysten en de test wordt uitgevoerd met Instar II-III larven.

5 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

5.1 VERDUNNINGSMEDIUM

{}

Testkits:

de ingrediënten voor het mineraal medium worden bij de testkit geleverd. Volg de instructies.

Eigen kweek Daphnia:

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 (voor *Daphnia* bv. JP4 medium (beschreven in de OECD richtlijn 202)).

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: $> 7 \text{ mg/l O}_2$

Tenminste 3 weken vóór de test wordt in de kweekcompartimenten hetzelfde medium gebruikt als tijdens de test.

5.2 REFERENTISTOF

Zinkchloride (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 (bv. 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 testconcentratie(s) worden bereid door de stockoplossing te verdunnen (diluties) met verdunningsmedium dat op voorhand belucht werd en op kamertemperatuur is ($18\text{-}22^\circ\text{C}$).
- **Voor verdunningsreeksen:** De concentraties voor de preliminaire test zijn meestal log 10 verdunningen met een maximale concentratie 1g/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 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: zie [WAC/I/A/010 voor bewaring en houdbaarheid](#)



Testuitvoering:

LIMIETTEST op afvalwater

Er worden enkel controles (verdunningsmedium) en 100% afvalwater getest. **In principe wordt de test uitgevoerd met *Daphnia magna*.** Indien de conductiviteit dit niet toelaat ($> 7500 \mu\text{S/cm}$) wordt de test uitgevoerd met *Artemia franciscana*.

VERDUNNINGSRREEKS

- De gewenste verdunningen worden aangemaakt in verdunningsmedium. 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 EC_{50}

waarde na 48 uur (*Daphnia*) of 24 uur (*Artemia*) 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 (*Daphnia*) of 24 uur (*Artemia*) geen immobilisatie 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 verdunningsmedium gebruikt.
- Indien extractieprocedures op het oorspronkelijke staal worden uitgevoerd, wordt verdunningsmedium op identieke wijze behandeld en wordt dit behandelde verdunningsmedium 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. **Indien de pH sterk afwijkt van de randvoorwaarden wordt de test in ieder geval met pH aanpassing uitgevoerd. Dit moet uitdrukkelijk worden vermeld in het rapport.**

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. **Dit neemt 30 uur in beslag voor *Artemia* en 3 dagen voor *Daphnia*.**

6.2 MONSTERVEROEBEREIDING EN METINGEN

De monsterveroebereiding 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 testverdunningen.

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.

Tabel 1: overzicht van de randvoorwaarden voor de beide testen

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
Artemia	5.0 - 9.0	>3	> 7500	nvt	< 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. Dit moet uitdrukkelijk in het rapport worden vermeld.
- Indien het zoutgehalte < 7500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ wordt de test met *Daphnia* uitgevoerd, indien het zoutgehalte > 7500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ wordt de test op *Artemia* uitgevoerd.
- Indien het ammoniumgehalte te hoog is kan via striptechnieken ammonium worden verwijderd.
- Verdunningen worden bereid zoals boven aangegeven (zie §5.3).

Noteer de meetresultaten en de behandelingen.

6.3 TESTUITVOERING

Daphniatest

Blootstellingscondities:

Algemeen:

- De blootstellingsduur bedraagt 48 uur.
- 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 gevoerd tijdens de test.

Testkit: gebruik het materiaal dat geleverd is bij de testkit en volg de instructies.

Klassieke opstelling

- De testrecipiënten worden tijdens de test losjes afgesloten met een doorzichtig deksel. Indien de teststof vluchtig is, wordt de testcontainer zorgvuldig afgesloten met een goed afsluitend deksel.

Testuitvoering

Algemeen:

- Collecteer het nodige aantal organismen (< 24 h oud of pas ontloken) en breng ze in de recipiënten.
- Noteer na de blootstelling het aantal overlevende organismen
- 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. **In principe wordt voor de afvalwaterbeoordeling 100% afvalwater getest.**

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 ().

Artemiatest**Blootstellingscondities:**

- De blootstellingsduur bedraagt 24 uur.
- Licht-donker cyclus: volledige duisternis.
- De testtemperatuur: 25°C ± 2 ; voor iedere afzonderlijke test mag de temperatuur bij voorkeur maximaal met 2 °C schommelen.
- De dieren worden niet gevoederd tijdens de test.
- Gebruik het materiaal dat geleverd is bij de testkit en volg de instructies.

Testuitvoering**Algemeen**

- Collecteer het nodige aantal organismen en breng ze in de recipiënten.
- noteer de mobiliteit van de organismen na 24 uur
- 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 10 organismen voor de controles en voor de geplande concentratie afvalwater

Verdunningsreeks

- Tenminste 40 dieren worden getest in elke concentratie, bij voorkeur in 4 groepen van 10 dieren (=4 replica's).
- Neem het nodige aantal recipiënten en nummer ze eenduidig.
- Vul elk recipiënt met de controle- en testvloeistoffen.

Voor beide testen:

De volgende gegevens worden op de laboformulieren vermeld: **codes voor de studie en de teststof**, speciesinformatie (**naam**, batchnummer), **testspecificatie** (limiettest, kit, pH aanpassing...), 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 medium, lichtcyclus en temperatuur, pH en zuurstofgehalte bij begin en eind van de test, conductiviteit van de oplossingen.

7 KWALITEITSCONTROLES

Tijdens de test

- De immobiliteit 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 3 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 **tenminste halfjaarlijkse** testen op een verdunningsreeks van een referentiestof, waarvan de EC₅₀ waarden genoteerd moeten worden in een gegevensbank.
- De gemiddelde EC₅₀ waarde voor ZnCl₂ op 48 uur **voor Daphnia** 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 **referentiestof voor** de specifieke batch voorhanden.
- Minstens 1x per jaar deelnemen aan een externe ringtest. **Bij gebruik van testkits 1x per jaar een controle uitvoeren met de referentiestof die bij de testkit wordt gerapporteerd. Bij gebruik van eigen gekweekte organismen tenminste 2 x per jaar een controletest met ZnCl₂ uitvoeren en de EC₅₀ waarde noteren in een shewart.**

8 BEREKENING VAN DE EC50 WAARDE (TEST OP VERDUNNINGSREEKS)

- Het percentage immobilisatie na 24 (*Artemia*) en 48 uur (*Daphnia*) wordt voor elke conditie berekend.
- Een grafiek met het cumulatieve percentage immobiliteit in functie van de concentratie voor **24 (*Artemia*) en 48 uur (*Daphnia*)** blootstelling wordt opgesteld.
- 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

Het testrapport bevat:

- gegevens over het testorganisme (wetenschappelijke naam, herkomst, batch {}.)
- beschrijving van de testbekers, hoeveelheden oplossing, aantal gebruikte dieren, aantal replica's
- **verdunningsmedium**
- **methode voor de bereiding van de testoplossingen**
- 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
- 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 (*Daphnia*) of 24 uur (*Artemia*)
- Voor verdunningsreeksen:
 - statistische procedures voor de bepaling van de EC₅₀-waarde
 - de EC₅₀-waarde (met – indien mogelijk - de 95% betrouwbaarheidsintervallen)
 - grafiek van deze concentratie/respons-curve
 - 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)

}

10 REFERENTIES

- ISO 6341: 1996 (E); Water Quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test.
- **Handleidingen testkits: Daphtoxkit f en Artoxkit M (bij elke testkit)**