

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 gevoederd 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

Verduunningsreeks

- 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 verduunningsreeks 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 Arttoxkit M (bij elke testkit)