

Ecotoxiciteitstest: algengroei-inhibitietest

INHOUD

1	TOEPASSINGSGBIED	3
2	PRINCIPE VAN DE TEST	3
3	OPMERKINGEN	4
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	5
4.1	<i>Apparatuur</i>	5
4.2	<i>Testorganismen</i>	5
5	REAGENTIA EN OPLOSSINGEN	5
5.1	<i>Groeimedium (verdunningsmedium)</i>	5
5.2	<i>Testoplossingen</i>	6
5.3	<i>referentiestof</i>	7
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>	9
9	REFERENTIES	10

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, uitloogfracties, extracten, waterige oplossing,...

De test kan als een chronische test worden beschouwd omdat de generatietijd korter is dan de blootstellingsduur.

De acute test op algen wordt gebruikt om de toxiciteit voor het trofische niveau van de primaire producenten te meten.

Afvalwaters met een hoog zoutgehalte ($\geq 4000 \mu\text{S}/\text{cm}$ geleidbaarheid) worden getest in de acute toxiciteitstest met de zoutwateralg *Phaeodactylum tricornutum*. Deze zoutwatertest heeft tot doel de aanwezigheid van schadelijke stoffen - die door zout gemaskeerd kunnen zijn - te detecteren.

Er zijn 3 versies van de test toegelaten voor de zoetwatertest:

- a) klassiek protocol zoals beschreven in OECD 201 en ISO 8692 – test in grotere recipiënten. 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 gebaseerd op ISO8692. Deze kan gebruikt worden voor testen op omgevingsstalen en zuivere producten.

Voor de zoutwatertest op omgevingsstalen wordt de Marine Algaltokit® gebruikt. Deze is gebaseerd op ISO 10253.

2 PRINCIPE VAN DE TEST

Exponentieel groeiende culturen van eencellige groene algen worden blootgesteld aan (een concentratiereeks van) de teststof gedurende verschillende generaties (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 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 de beoordeling van de toxiciteit van afvalwaters wordt een limiettest op 95-97.5% afvalwater (met 2.5-5% nutriënten) uitgevoerd, en worden de effecten na 72h blootstelling gerapporteerd. Voor het kwantificeren van toxiciteit en toxiciteitswijzigingen kunnen testen met verdunningsreeksen worden uitgevoerd die toelaten om de gewenste effectwaarden (EC_x) te bepalen. Hiervoor wordt voor afvalwaters een ½ verdunningsreeks gemaakt (100-50-25-12.5-6.25 %) die aan 95-97.5% wordt getest in de algentest. Bij hoge toxiciteit kunnen verdere verdunningen worden getest.

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: EC₅₀, NOEC en LOEC, 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
- Coulter counter of/en fluorometer
- pH meter
- geleidbaarheidsmeter
- methode voor ammoniumbepaling
- recipiënten met luchtdoorlatende stoppen of
- 48 well platen of
- Testkits Algaltoxkit/Marine Algaltoxkit

4.2 TESTORGANISMEN

Men gebruikt om praktische redenen bij voorkeur snelgroeiende soorten van eencellige groene algen.

Aanbevolen voor zoet water: *Pseudokirchneriella subcapitata*

Aanbevolen voor zout water: *Phaeodactylum tricornutum*

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 10⁷ cellen/ml). De stock moet voldoende geconcentreerd zijn om geen grote verdunning van de teststof te hebben bij toevoeging van algensuspensie.

Voor Algaltoxkit® en Marine Algaltoxkit®: volg de handleiding.

5 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

5.1 GROEIMEDIUM (VERDUNNINGSMEDIUM)

De Algaltoxkit® en Marine Algaltoxkit® bevatten de nodige componenten om de media aan te maken. Volg de handleiding.

Voor de erlenmeyertest en 48 well plaat test met *P.subcapitata*: de media beschreven in OECD 201 en ISO 8692 zijn geschikt voor de uitvoering van de algentest.

5.2 TESTOPLOSSINGEN

Afvalwaters:

Voor bewaring en bewaartermijnen: WAC/I/A/010

Randvoorwaarden meten: meet de pH in alle testverduunningen.

Voor (afval)waterstalen is het ook belangrijk de geleidbaarheid, 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)
<i>P.subcapitata</i>	7.0 – 9.0	< 4000	< 1000	< 1300	< 25
<i>P.tricornutum</i>	7.0 – 9.0	\geq 4000	{ } g.d.	{ } g.d.	< 25

g.d.: geen data

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

Bij overschrijding van de randvoorwaarde geleidbaarheid, nl. indien ≥ 4000 wordt de zoetwater alg vervangen door de mariene alg, met de "Marine Algaltoxit[®]". Omdat deze geleidbaarheid te laag is voor optimale groei van de mariene alg dient er NaCl toegevoegd te worden. Er wordt aan het onverdunde afvalwater 10 g/l NaCl toegevoegd indien het afvalwater een geleidbaarheid heeft in de range van 4000 – 22000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Dit wordt gerapporteerd bij uitvoering van de groei inhibitie test met de zoutwater alg.

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.

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 tot 100%. Op de helling van de curve liggen idealiter de effectwaarden van 2 tot 3 testconcentraties.

Voor (afval)waterstalen worden in eerste instantie standaardverduunningen gebruikt: 100-50-25-12.5-6.25 % van het oorspronkelijke staal. (Verduunningen in water: deze worden aan 95-98.5% getest na toevoeging van medium).

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.

5.3 REFERENTIESTOF

Zinkchloride (ZnCl₂).{}

6 PROCEDURE

6.1 BLOOTSTELLINGSCONDITIONS

ALGEMEEN

- Temperatuur: 20°C +/- 2
- Licht: continu, voldoende om een normale groei in controles te bekomen.
- schudden: tenminste dagelijks schudden of continu
- 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).
- De testopstelling omvat:
Tenminste 3 replica's voor de blanco's en 3 replica's voor de overige testconcentraties wanneer een verdunningsreeks wordt getest, 6 replica's voor controle- en testconditie indien een limiettest wordt uitgevoerd.

6.2 TESTUITVOERING

ALGEMEEN

De blootstellingsduur is 72h.

De algenconcentratie wordt gemeten (tenminste) bij het begin en het einde van de test.(de celconcentratie kan gemeten worden met behulp van een coulter-counter (met gefiltreerd algenmedium als achtergrondwaarde), of een andere geschikte methode (Fluorescentie, Optische Dichtheid(spectrofotometrie)). In elke testkit is de correlatie tussen OD en biomassa gedocumenteerd. Voor organismen van eigen kweek moet de correlatie experimenteel vastgesteld worden).

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 10⁷ 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 recipiënten 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. Voor het testen van chemische stoffen kunnen de verdunningen in niet geconcentreerd medium worden aangemaakt.*

Algaltokit® en marine Algaltokit®:

- 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 variatiecoëfficiënt van de specifieke groeisnelheden voor de hele testperiode (dag 0 -> dag 3) in de replica's van de controles, mag niet hoger zijn dan 5%.
- Voor verdunningsreeksen: 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.
- Minstens jaarlijks deelname aan een externe ringtest en bij gebruik van kits minstens een keer per jaar een controle op de gevoeligheid voor de referentiestof die bij de kit gerapporteerd wordt. Bij eigen gekweekte organismen tenminste 2 x per jaar een controletest met ZnCl₂ uitvoeren en de EC₅₀ waarde noteren in een shewart.

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.

ALGALTOXKITS: bij gebruik van de (mariene) algaltoxkits, 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. {}
 - 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 log Biomassa 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 (2012): Water quality: freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae
- ISO 10253 (2016): Water quality: marine algal growth inhibition tests with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*.