

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*.