

## **Ecotoxiciteitstest met invertebraten: acute toxiciteit voor de watervlo (*Daphnia magna*) of het pekelkreeftje (*Artemia franciscana*)**

## INHOUD

|          |                                                                          |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>TOEPASSINGSGEBIED</b>                                                 | <b>4</b>  |
| <b>2</b> | <b>KEUZE VAN TESTORGANISME</b>                                           | <b>4</b>  |
| <b>3</b> | <b>PRINCIPE VAN DE TESTEN</b>                                            | <b>5</b>  |
| 3.1      | <i>Immobiliteit als eindpunt voor acute toxiciteit bij invertebraten</i> | 5         |
| 3.2      | <i>Limiettest</i>                                                        | 5         |
| 3.3      | <i>Verdunningsreeks</i>                                                  | 5         |
| <b>4</b> | <b>DEFINITIES</b>                                                        | <b>5</b>  |
| <b>5</b> | <b>ACUTE TOXICITEIT VOOR DE WATERVLO, DAPHNIA MAGNA</b>                  | <b>6</b>  |
| 5.1      | <i>Inleiding</i>                                                         | 6         |
| 5.2      | <i>Apparatuur en materiaal</i>                                           | 7         |
| 5.3      | <i>Reagentia en oplossingen</i>                                          | 7         |
| 5.4      | <i>Watermonster</i>                                                      | 7         |
| 5.5      | <i>Werkwijze</i>                                                         | 8         |
| 5.5.1    | Controle medium of verdunningswater                                      | 8         |
| 5.5.2    | Testorganismen                                                           | 9         |
| 5.5.3    | Testoplossingen van het watermonster                                     | 9         |
| 5.5.4    | Blootstelling                                                            | 10        |
| 5.5.5    | Evaluatie van test                                                       | 11        |
| 5.5.6    | Berekening van resultaat voor acute toxiciteit na 48 u                   | 11        |
| 5.5.7    | Kwaliteitscontrole                                                       | 12        |
| 5.5.8    | Rapportering                                                             | 12        |
| <b>6</b> | <b>ACUTE TOXICITEIT VOOR HET PEKELKREEFTJE, ARTEMIA FRANCISCANA</b>      | <b>13</b> |
| 6.1      | <i>Inleiding</i>                                                         | 13        |
| 6.2      | <i>Apparatuur en materiaal</i>                                           | 13        |
| 6.3      | <i>Reagentia en oplossingen</i>                                          | 14        |
| 6.4      | <i>Watermonster</i>                                                      | 14        |
| 6.5      | <i>Werkwijze</i>                                                         | 15        |
| 6.5.1    | Zoutwater medium of verdunningswater                                     | 15        |
| 6.5.2    | Testorganismen                                                           | 16        |
| 6.5.3    | Testoplossingen van het watermonster                                     | 16        |
| 6.5.4    | Blootstelling                                                            | 17        |
| 6.5.5    | Evaluatie van test                                                       | 18        |
| 6.5.6    | Berekening van resultaat voor acute toxiciteit na 24 u                   | 18        |
| 6.5.7    | Kwaliteitscontrole                                                       | 18        |
| 6.5.8    | Rapportering                                                             | 19        |
| <b>7</b> | <b>REFERENTIES</b>                                                       | <b>20</b> |

---

|                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>BIJLAGE A : Labocultuur van watervlo, <i>Daphnia magna</i></b>   | <b>21</b> |
| A.1 <i>Kweek van watervlooien</i>                                   | 21        |
| <b>BIJLAGE B : Controle en verdunningsmedium voor watervlo test</b> | <b>22</b> |
| B.1 <i>Bereiding stockoplossingen</i>                               | 22        |
| B.2 <i>Bereiding van verdunningsmedium</i>                          | 22        |

## 1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de werkwijze om de acute toxiciteit voor 2 soorten van aquatische invertebraten (kreeftachtigen) te bepalen. Deze organismen vertegenwoordigen het trofische niveau van de primaire consumenten in het aquatisch ecosysteem.

De procedure is van toepassing voor

- Diverse waterige milieumatrices: afval-, oppervlakte-, drink- en grondwater.
- Waterige oplossingen met chemische stoffen (zoals voor eerstelijnscontrole), mits deze goed oplosbaar zijn in water, of in oplossing blijven als stabiele suspensie of via dispersie, of met gebruik van een solvent.

De invertebraten test op watermonsters wordt normaal uitgevoerd met het zoetwaterorganisme *Daphnia magna*, de watervlo.

Echter in sommige waters kan de geleidbaarheid door aanwezige zouten zodanig hoog zijn, dat er schadelijke effecten kunnen optreden voor het zoetwaterorganisme (bv. toxiciteit door osmotische stress). De acute toxiciteit door milieugevaarlijke stoffen kan bijgevolg beïnvloed of gemaskeerd worden door effecten van het zout. Om die reden worden er voor een testorganisme zogenaamde 'randvoorwaarden' voor de fysicochemische parameters **gedefinieerd**. **Er werd via VITO onderzoek aangetoond dat het meten van de geleidbaarheid een goede maat is voor de totale ionensterkte van de aanwezige zouten**, waarvan chloriden en sulfaten de belangrijkste zijn, **gedefinieerd**. Indien de fysicochemische parameter geleidbaarheid voor de watervlo overschreden is, dan zal men voor de invertebraten test het zoutwaterorganisme *Artemia franciscana*, of het pekelkreeftje kiezen.

## 2 KEUZE VAN TESTORGANISME

Voor de juiste keuze van het testorganisme is meting van geleidbaarheid<sup>‡</sup> in het water een vereiste. Deze meting van geleidbaarheid wordt getoetst aan de randvoorwaarde voor de watervlo (Tabel 1 ~~gebaseerd op Postma et al. 2002~~). Bij een overschrijding moet gekozen worden voor het pekelkreeftje als testorganisme (zie 6). De meetresultaten voor deze randvoorwaarde wordt gedateerd en gerapporteerd, ter motivatie voor de keuze van het testorganisme.

**Tabel 1: Randvoorwaarde geleidbaarheid in water voor de watervlo**

| Parameter                      | Geleidbaarheid<br>( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) |
|--------------------------------|-----------------------------------------------|
| Watervlo, <i>Daphnia magna</i> | $\leq$ <del>6700</del> <b>6500</b>            |

<sup>‡</sup> ~~Bijkomende criteria als concentratie van chloriden en sulfaten maken deel uit van lopend onderzoek en worden momenteel nog niet gehanteerd bij keuze testorganisme.~~

### 3 PRINCIPE VAN DE TESTEN

#### 3.1 IMMOBILITEIT ALS EINDPUNT VOOR ACUTE TOXICITEIT BIJ INVERTEBRATEN

Bij de acute toxiciteitstest met de watervlo, *Daphnia magna* (zie 5) of het pekelkreeftje, *Artemia franciscana* (zie 6) worden de testorganismen respectievelijk 48 u of 24 u blootgesteld aan het watermonster en dit in vergelijking met het controle medium. De immobiliteit van de testorganismen wordt op het einde van de blootstellingsperiode gemeten. Acuut toxische effecten worden uitgedrukt als % effect, berekend op basis van het aantal immobiele organismen in de testgroep t.o.v. totaal aantal mobiele bij aanvang van de test. Een organisme wordt als immobiel gescoord wanneer het niet meer in staat is om te zwemmen, nadat het testrecipiënt zachtjes wordt bewogen.

#### 3.2 LIMIETTEST

Voor het meten van de toxiciteit van waters wordt standaard een limiettest uitgevoerd op onverdund water (100%). Voor de watervlo wordt het % effect na 48 u blootstelling aan het onverdunde water gerapporteerd, en voor het pekelkreeftje het % effect na 24 u blootstelling, en dit telkens in vergelijking met het % effect bij blootstelling aan controle medium.

#### 3.3 VERDUNNINGSREEKS

Uitzonderlijk worden de testen uitgevoerd op een verdunningsreeks van het watermonster. Dit kan van toepassing zijn wanneer dit vereist is in het kader van de bijzondere voorwaarde in een vergunning of bij verder onderzoek naar oorzaken van acute toxiciteit (TIE-Toxiciteit identificatie & evaluatie). Ook bij het testen van een referentiestof, als deel van kwaliteitscontrole, kan de test in een verdunningsreeks opgezet worden. Daarbij wordt het watermonster (of de referentiestof) in een reeks van minstens 5 concentraties getest, bijvoorbeeld 100%, 50%, 25%, 12.5% en 6.25%, naast de controle conditie op basis van een verdunningsfactor 2, die groter kan zijn naargelang de beoogde concentratierange. De concentratiereeks van het watermonster of de referentiestof wordt zodanig gekozen dat de hoogste concentratie ongeveer 100% effect oplevert, en de laagste concentratie 0% effect (of niet significant verschillend van de controle). Dit laat toe een grafiek met concentratie-effect voor immobiliteit te genereren, alsook een EC<sub>50</sub>-waarde te berekenen die de concentratie van het watermonster of referentiestof geeft waarbij 50% van de testorganismen geïmmobiliseerd zijn. Bij deze test met een verdunningsreeks kan eveneens het % effect, zoals in de limiettest, bepaald worden voor het onverdunde water of de hoogste testconcentratie van de reeks.

### 4 DEFINITIES

- Cysten: startmateriaal van testorganismen in de MicrobBiotTests ArtoxkitM voor het pekelkreeftje. Deze cysten worden verzameld van *Artemia* vrouwtjes die in ongunstige omstandigheden gekweekt worden; deze cysten zijn droge dormante stadia die langere tijd kunnen bewaard worden.
- Ehippia (of rusteieren, ook dormante stadia): startmateriaal van testorganismen in de MicrobBiotTests DaphtoxkitF voor watervlo. Dit zijn bevruchte eieren, die gevormd worden bij ongunstige omstandigheden, en een langere periode kunnen overleven, en onder die vorm in de testkits worden aangeboden.

- EC<sub>50</sub> (50 % effectconcentratie): dit is de concentratie van het watermonster of een referentiestof waarbij 50% van de testorganismen in een testgroep geïmmobiliseerd zijn na een bepaalde blootstellingsperiode.
- Immobiele organismen: testorganismen die niet in staat zijn om, nadat de testbeker of de multiwell plaat zachtjes wordt bewogen, te zwemmen in eerstvolgende 15 seconden (enkel bewegen van de antennes is niet voldoende).
- Limiettest: in de test wordt 1 concentratie van het water (nl. de hoogste concentratie 100% of het onverdunde water) geëvalueerd in vergelijking met controle medium.
- Neonaat: pasgeboren, of nieuw ontloken watervlo-~~of pekelkreeftje~~, minder dan 24 u oud.
- Randvoorwaarden: voor het watermonster geldende grenzen voor fysicochemische parameters, zoals pH, O<sub>2</sub>, geleidbaarheid, waarbij er geen effect op (acute) toxiciteit wordt verwacht ten opzichte van de controle conditie.
- Referentiestof: een referentiestof wordt getest om aan te tonen dat de gevoeligheid van de geteste soort onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate veranderd is en/of de uitvoering van de test voldoet aan vooropgestelde criteria qua te verwachten toxische effecten voor de referentiestof (positieve controle).
- Toxiciteit identificatie en evaluatie (TIE): onderzoek naar de oorzaken van toxiciteit door watermonsters te onderwerpen aan diverse behandelingen (filtratie, actieve kool, organische extractie) met het doel de toxiciteit toe te wijzen aan bepaalde fracties uit deze behandelingsstappen.

## 5 ACUTE TOXICITEIT VOOR DE WATERVLO, DAPHNIA MAGNA

### 5.1 INLEIDING

Voor de watervlo test is deze WAC-methode gebaseerd op de internationale richtlijnen ISO 6341 (2012) en OECD 202 (2004).

Voor de uitvoering van deze test wordt een commerciële kit gebruikt, de DaphtokitF (<https://www.microbiotests.com/>). Stocks van het controle medium (of dilutie medium), testrecipiënt en organismen, in de vorm van te ontluiken watervlooien uit rusteieren maken deel uit van de kit. De werkwijze wordt hierna verder beschreven, en voor meer informatie kan beroep gedaan worden op de handleiding bij de kit.

Voor deze test is het ook toegestaan gebruik te maken van watervlooien uit een continue cultuur in het labo, mits deze gezond zijn en geen tekenen van stress vertonen (specificaties: zie BIJLAGE A), waarbij neonaten minder dan 24 u oud worden afgezeefd voor blootstelling in de test. Verder kan het controle medium (en dilutie medium) zelf bereid worden in het labo vertrekkende van reagentia van analytische kwaliteit. Een werkwijze voor de bereiding en de samenstelling van het medium zijn te vinden in BIJLAGE B.

De test moet uitgevoerd worden met 20 testorganismen per conditie, verdeeld in 4 technische replica's van elk 5 organismen. Voor elk testorganisme is een minimum volume van 2 ml test oplossing vereist, zodat een testrecipiënt 5 organismen (1 replica) in minstens 10 ml testvolume bevat. De test wordt uitgevoerd bij (20 ± 2) °C en dit kan in volledig donker, of bij een 16 u licht/8 u donker regime. Binnen één testreeks moeten steeds dezelfde omstandigheden aangehouden worden.

## 5.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Zuurstofmeter voor bepaling conform WAC/III/A/008
- Thermometer en logger voor registratie min./max. temperatuur
- pH-meter voor pH meting conform WAC/III/A/005
- Geleidbaarheidsmeter voor meting geleidbaarheid conform WAC/III/A/004
- ~~Materiaal en apparatuur voor de bepaling van chloriden en sulfaten conform WAC-procedure WAC/III/C~~
- Materiaal en apparatuur voor de bepaling van ammonium
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg
- Klimaatkamer of incubator met instelbare temperatuur ( $20 \pm 2$ )°C, en instelbare lichtcyclus
- Beluchting systeem (olie-vrij)
- Lichtbron, 6000-8000 Lux
- Lux meter
- Pipetten en toebehoren
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven, maatcilinders voor bereiding van testoplossingen en verdunningen
- Recipiënten voor meting van fysicochemische parameters
- Petriplaat (5cm  $\phi$ ) met deksel voor het ontluiken van de ehippia (zie DaphtoxkitF)
- Multiwell testplaten met parafilm (zie DaphtoxkitF) of glazen testbekers voor min. 10 ml testvolume elk, met losse deksel
- Micropipetten voor transfer van testorganismen
- Tube met ehippia van Daphnia magna (zie DaphtoxkitF) of organismen uit eigen kweek (zie BIJLAGE A).
- Tube met Spirulina poeder (zie DaphtoxkitF)
- Zeef 100  $\mu\text{m}$   $\phi$
- Lichttafel, vergrootglas met licht of omgekeerde microscoop (10x)

## 5.3 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Gedemineraliseerd water ( $< 10 \mu\text{S/cm}$ ).
- Geconcentreerde zoutoplossingen (zie DaphtoxkitF) of 4 zouten, nl. calciumchloride, magnesiumsulfaat, natriumbicarbonaat en kaliumchloride van analytische kwaliteit voor de bereiding van controle medium en verdunningsmedium (bereiding, zie BIJLAGE B).
- HCl, 0.1N en NaOH, 0.1N
- Kaliumbichromaat, analytische kwaliteit (referentiestof, zie 5.5.7, Kwaliteitscontrole).

## 5.4 WATERMONSTER

Voor de monsternamen en houdbaarheid wordt verwezen naar respectievelijk WAC/I/A/003, WAC/I/A/004 en WAC/I/A/010.

Bij gebruik voor fysicochemische metingen om de randvoorwaarden te controleren wordt een gehomogeniseerd, en representatief deelstaal van het water genomen en op kamertemperatuur gezet.

Naast de meting van geleidbaarheid bij keuze van testorganisme (zie 2) moet eveneens pH, zuurstof, ~~chloride, sulfaat~~ en ammonium gemeten en gerapporteerd worden. Voor de meeste van deze parameters zijn er aanvaardbare ranges gedefinieerd waarbij er geen effect verschillend van controle ( $\leq 10\%$ ) op immobiliteit mag optreden (Tabel 2, Postma et al. 2002, en gegevens MicrobBiotTests).

**Tabel 2: Randvoorwaarde voor fysicochemische parameters voor watervlo**

| Parameter                      | pH                   | Zuurstof (mg/l) | <del>Chloriden (mg/l)</del> | <del>Sulfaten (mg/l)</del> | Ammonium (mg/l NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) |
|--------------------------------|----------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------|
| Watervlo, <i>Daphnia magna</i> | 6 – 8.5<br>> 8.5 - 9 | ≥ 3.6           | <1800                       | g.d.                       | < 54<br>< 15                                  |

g.d. = geen data

Indien de pH van het watermonster buiten de toegelaten range valt (< 6 of > 9), dan wordt meteen de pH aangepast met zuur of base tot een pH-waarde overeenkomstig die van het controle medium ± 0.1.

Indien het zuurstofgehalte lager is dan 3.6 mg/l, dan wordt het watermonster gedurende 20 min., net voor aanvang van de test, belucht.

De aanpassingen voor pH en zuurstof worden gerapporteerd.

De metingen van ~~chloriden, sulfaten en~~ ammonium worden gerapporteerd. In geval van afwijkende randvoorwaarde voor ammonium ~~en chloriden~~ wordt er niet gecorrigeerd, maar wordt overschrijding van randvoorwaarde duidelijk vermeld in het rapport, als mogelijke parameter die bijdraagt tot gemeten toxiciteit, naast deze die te wijten zou zijn aan milieugevaarlijke stoffen.

In overleg met de opdrachtgever kan bij afwijking van ammonium alsnog een nieuwe test worden uitgevoerd door aanpassingen te doen aan het water (bijv. beluchten om ammoniak te strippen, of bufferen voor pH om ammonium/ammoniak effect uit te sluiten) gevolgd door meting van ammonium. Dergelijke aanpassingen aan het watermonster moeten gerapporteerd worden als een afwijking op de methode.

## 5.5 WERKWIJZE

### 5.5.1 CONTROLE MEDIUM OF VERDUNNINGSWATER

Er zijn 4 flesjes in de DaphtokitF met geconcentreerde zoutoplossingen, om 2 liter medium te maken dat qua samenstelling beantwoordt aan het ISO 6341 medium 'Standard freshwater'. Voor de volledige bereiding vertrekkende van het afwegen van de respectievelijke zouten wordt verwezen naar BIJLAGE B.

Dit medium wordt eveneens gebruikt om de rusteieren te ontluiken (zie 5.5.2.1).

**Tabel 3: Geconcentreerde zoutoplossingen in DaphtokitF**

| Flesje | Zoutoplossing                        | Hoeveelheid (voor 2 liter medium) | Concentratie in bereid medium |
|--------|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| 1      | NaHCO <sub>3</sub>                   | 129.5 mg                          | 64.75 mg/l                    |
| 2      | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 588 mg                            | 294 mg/l                      |
| 3      | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 246.5 mg                          | 123.25 mg/l                   |
| 4      | KCl                                  | 11.5 mg                           | 5.75 mg/l                     |

- Neem een maatkolf van 2 liter, en vul met ongeveer 1 liter gedemineraliseerd water.
- Open het flesje 1 en breng volledige inhoud in de 2 liter kolf.
- Doe dit achtereenvolgens ook voor flesjes 2, 3 en 4.
- Leng aan tot 2 liter in de maatkolf, sluit af en goed mengen.
- Label de kolf, en bewaar in het donker en koel (5 ± 3)°C tot gebruik.



Bij gebruik van het medium voor het ontluiken van rusteieren of om verdunningen te maken, wordt het langzaam op kamertemperatuur gebracht, en wordt het gedurende 15 minuten voor gebruik belucht via doorborreling.

### 5.5.2 TESTORGANISMEN

De acute toxiciteitstest met watervlo wordt gestart met neonaten, nl. organismen jonger dan 24 u **bij gebruik van neonaten uit een continue cultuur van watervlooien of pas ontloken organismen uit rusteieren van de watervlo.**

Voor het gebruik van neonaten uit een continue cultuur van watervlooien wordt verwezen naar BIJLAGE A.

#### 5.5.2.1 ONTLUIKEN VAN RUSTEIEREN

In de DaphtoxkitF is er een tube voorzien met rusteieren of ephippia in bewaarmedium. Het ontluiken van de rusteieren wordt gestart 3 dagen voor aanvang van de toxiciteitstest.

- Giet de inhoud van het buisje met rusteieren over de zeef (100 µm poriën), en verifieer of de volledige inhoud verwijderd is, en spoel na met leidingwater.
- Spoel de rusteieren op de zeef grondig na met leidingwater zodat het bewaarmedium verwijderd wordt.
- Breng de rusteieren in een petriplaat (5 cm  $\phi$ ), die gevuld is met 15 ml belucht controle medium.
- Dek de petriplaat af, en plaats gedurende 72 u, bij 20 - 22°C (**watertemperatuur**) onder continue belichting van minstens 6000 lux (vereiste lichtintensiteit aan het oppervlak van de petriplaat).
- Bij optimale omstandigheden van licht en temperatuur zullen de 1<sup>ste</sup> watervlooien reeds ontluiken vóór 72 u, maar de meerderheid zal ontluiken tussen 72 u en 80 u. **Om de leeftijd van < 24 u te garanderen bij start van de test, moeten de neonaten binnen de 90 u na aanvang van de incubatie verzameld worden.**

#### 5.5.2.2 VOEDING VAN NEONATEN

De neonaten gecollecteerd uit een continue cultuur (zie BIJLAGE A) zullen voedsel (algen) opnemen vanuit de stockcultuur waarin ze geboren zijn, hetgeen volstaat als energiereserve tijdens de 48 u blootstelling.

De neonaten gecollecteerd uit rusteieren van de DaphtoxkitF dienen gevoed te worden vóór aanvang van de toxiciteitstest.

- Neem een tube met Spirulina poeder uit de DaphtoxkitF, leng aan met het bereid controle medium (zie 5.5.1) en sluit de tube af.
- Homogeniseer zorgvuldig door te vortexen.
- Breng 2 u  $\pm$  10 min. vóór de start van de toxiciteitstest de volledige inhoud met Spirulina in de petriplaat met de ontluikende ephippia, en **warrel roer** voorzichtig zodat de voeding goed verdeeld is.

### 5.5.3 TESTOPLOSSINGEN VAN HET WATERMONSTER

Het water wordt op kamertemperatuur gebracht, en goed gehomogeniseerd door schudden voor gebruik. De testoplossingen worden vers bereid tot maximum 4 uur voor aanvang van de test.

Voor elk van de testoplossingen wordt minstens 100 ml gemaakt, zodat er voldoende is om per testconditie 4 replica's van elk 10 ml voor de blootstelling op te zetten en meting van fysicochemische parameters te doen.

### 5.5.3.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

Het watermonster wordt standaard in een limiettest geëvalueerd als onverdund water (hoogste testconcentratie of 100% water) in vergelijking met een controle conditie (100% verdunningswater).

### 5.5.3.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC<sub>50</sub> BEPALING

Indien van toepassing (bijv. volgens bijzondere voorwaarde in vergunning van het bedrijf) moet het watermonster in een verdunningsreeks getest worden om een EC<sub>50</sub> waarde te bepalen. Hiervoor wordt het water verdund met verdunningswater (zie 5.5.1), voor minstens 5 concentraties met bijv. een verdunningsfactor 2, namelijk 100%, 50%, 25%, 12.5% en 6.25% in vergelijking met controle (0% water in verdunningswater).

Uitzonderlijk is een range finding test nodig, bijv. indien zeer hoge toxiciteit verwacht wordt. Hierbij wordt een verdunningsreeks opgezet met hoge verdunningsfactor, bijv. 10 om de 0-100% effectrange te vinden. Uit deze test wordt de verfijnde testrange (met lagere verdunningsfactor, minimum 2) afgeleid met concentraties van water waarbij minstens 1 punt met 100% effect en een punt met een effect  $\leq 10\%$ , en met indien mogelijk meerdere punten op de helling van de concentratie-effect curve om een nauwkeurige EC<sub>50</sub> waarde te berekenen. Indien er weinig tot geen effect is ( $< 50\%$  acute toxiciteit), kan er geen EC<sub>50</sub> waarde bepaald worden.

## 5.5.4 BLOOTSTELLING

### 5.5.4.1 BLOOTSTELLINGSCONDITIES

- Duur:  $(48 \pm 2)$  u
- Licht-donker cyclus: volledige duisternis (DaphtokitF) of 16 u licht/8 u donker
- Temperatuur van testoplossingen:  $(20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  tijdens blootstelling, een temperatuurgecontroleerde ruimte te gebruiken voor de test. Via een temperatuurlogger in een testbeker (10 ml test vloeistof) naast de testrecipiënten wordt de temperatuur opgevolgd gedurende de blootstellingsperiode. Gedurende de test mag het temperatuurverschil niet meer dan  $2^{\circ}\text{C}$  bedragen
- Testrecipiënt: well plaat zoals voorzien bij DaphtokitF, 4 x 6 wells van 10 ml en 6 wells om te spoelen, of glazen testbekers van voldoende volume. Testrecipiënten worden afgedekt met parafilm of losse deksel
- Testvolume: 2 ml per neonaat, en 5 organismen per replica, dus 10 ml per replica van een testconditie, nl. controle of concentratie(s) van het watermonster
- Replica's: 4 per testconditie
- Deze condities zijn dezelfde bij de limiettest en test met verdunningsreeks.

### 5.5.4.2 TRANSFER NEONATEN NAAR TESTOPLOSSINGEN

- Voorzie het nodige aantal organismen (leeftijd  $< 24$  u) uit stock cultuur of na ontluiken van rusteieren (en gevoed) en voorzie hulpmiddel (bv. lichttafel, omgekeerde microscoop) en een micropipet voor de transfer.
- Vul testrecipiënten (wells of bekertjes) met het vereiste testvolume van water of controle medium.
- Voorzie voor elk van de verschillende testcondities, 1 gevuld recipiënt voor de transfer van de neonaten (= spoelrecipiënt: well of beker).
- Breng minstens 20 actief zwemmende neonaten uit de voorraad over met een micropipet naar het spoelrecipiënt voor elk van de testoplossingen, te beginnen met de controle, en dan oplopende concentratie van het watermonster. Probeer om vloeistof overdracht bij transfer van neonaten te beperken.

- Neem een zuivere micropipet, en breng nu exact 5 neonaten uit het spoelrecipiënt naar elk van de 4 replica testrecipiënten (wells of beker) per testconditie. Doe deze handeling voor elk van de condities in volgorde van oplopende concentratie watermonster. Vermijd dat de watervlooiën aan het wateroppervlak blijven drijven (oppervlaktespanning!), door de micropipet met de neonaten onder het oppervlak te brengen en dan pas de neonaten vrij te laten in het medium.
- Controleer organismen in elk van de testcondities en registreer op laboformulier de gegevens van blootstelling en testorganismen. De testrecipiënten worden afgedekt en incubatie bij juiste temperatuur en lichtcondities kan starten.
- De resterende testoplossingen zullen gebruikt worden voor meting van pH en zuurstof bij start van de test. Uitsluitend in het controle medium en in de hoogste testconcentratie van het watermonster, zowel voor de limiettest, als bij de verdunningsreeks moet er gemeten worden.

#### 5.5.5 EVALUATIE VAN TEST

- Zowel in de limiettest als bij een verdunningsreeks wordt het resultaat enkel na  $(48 \pm 2)$  u afgelezen.
- De testrecipiënten worden geëvalueerd voor het aantal immobiele organismen in elk van de replica's van elke testconditie, en overeenkomstig geregistreerd. Neonaten die niet meer zwemmen, na voorzichtig schudden met recipiënt worden als immobiel gescoord, zelfs indien ze nog bewegen met hun antennes.
- De testvloeistof van de 4 replica's per testconditie wordt voorzichtig overgebracht in een meetrecipiënt (gepooled) om opnieuw pH en zuurstof te meten. Dit is enkel nodig voor de controle conditie en de hoogste concentratie van het geteste watermonster, zowel in limiettest, als test met verdunningsreeks.
- De temperatuurregistraties tijdens het verloop van de test worden afgelezen, terwijl minimum- en maximumtemperatuur voor de volledige duur van de test gerapporteerd worden.
- Verwijder de testorganismen en de testoplossingen als chemisch afval.

#### 5.5.6 BEREKENING VAN RESULTAAT VOOR ACUTE TOXICITEIT NA 48 U

##### 5.5.6.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

De aflezing van het aantal immobiele organismen op  $(48 \pm 2)$  u (gesommeerd voor de 4 replica's) resulteert in een cumulatief aantal immobiele organismen, ten opzichte van het totaal mobiele organismen ( $n=20$ ) bij aanvang van de test. Het resultaat wordt omgerekend in % van organismen met een effect (immobiel) voor de hoogst geteste concentratie van het watermonster (onverdund) en voor de controle conditie.

##### 5.5.6.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR $EC_{50}$ BEPALING

- Voor elke concentratie van het watermonster en voor de controle wordt het aantal immobiele organismen berekend en uitgedrukt als % effect na  $(48 \pm 2)$  u blootstelling. Dit is naar analogie met de limiettest.
- De resultaten van % effect (Y-as) worden grafisch voorgesteld als functie van de concentratie (% verdunning) van het water (X-as). Mits een goede concentratie-effect relatie kan er ook een  $EC_{50}$  waarde berekend worden.
- Een  $EC_{50}$  waarde kan afgeleid of berekend worden op verschillende manieren (grafische interpolatie of statistische methoden, als probit analyse). Indien twee opeenvolgende

concentraties met een onderlinge concentratieverhouding van 2 respectievelijk 0 en 100% effect veroorzaken, is het voldoende de EC<sub>50</sub> te situeren tussen deze beide concentraties.

### 5.5.7 KWALITEITSCONTROLE

#### 5.5.7.1 EERSTELIJNSCONTROLE

##### *Beslissingscriterium voor geldigheid van de test:*

- De immobiliteit in de controlegroep moet op het einde van de test voldoen aan  $\leq 10\%$ . De waarde(n) voor immobiliteit in de controlegroep moeten bijgehouden worden in een limietkaart.
- De variatie tussen replica's per testconditie moet minder zijn dan 3 organismen, en dit voor alle testcondities van een watermonster.

##### *Herkomst en kwaliteit van testorganismen:*

- Bij het gebruik van ehippia uit de DaphtoxkitF wordt steeds het batchnummer op het laboformulier vermeld. De gegevens over de gevoeligheid van elke gebruikte batch in de vorm van een EC<sub>50</sub> voor referentiestof, uitgevoerd door MicroBiotTests worden bijgehouden in een databestand.
- Bij gebruik van neonaten uit eigen kweek is een logboek ter beschikking om het onderhoud met medium verversing, voeding en gezondheid van de kweek op te volgen.

#### 5.5.7.2 TWEEDELIJNSCONTROLE

- De methode toegepast in het labo, hetzij met ehippia, hetzij met organismen uit eigen stock, wordt op de hieronder vermelde frequenties uitgevoerd met een positieve controle (Kaliumbichromaat) waarvoor de EC<sub>50</sub> bepaald wordt na 24 u en 48 u voor een dilutiereeks van 3.2 tot 0.32 mg/l (voor details zie handleiding DaphtoxkitF):
  - De EC<sub>50</sub> wordt geregistreerd in een statistische controlekaart, naast deze van de corresponderende batch voor de DaphtoxkitF, indien van toepassing.
  - De minimale frequentie voor een intralaboratorium test met positieve controle is als volgt:
    - Bij wekelijkse uitvoering van de test: driemaandelijks positieve controle testen
    - Bij maandelijkse uitvoering: zesmaandelijks een positieve controle test
    - Bovendien zal ieder van de betrokken uitvoerders minstens 1 maal per jaar een test met positieve controle uitvoeren.

#### 5.5.7.3 DERDELIJNSCONTROLE

Minstens 1x per jaar deelnemen aan een externe ringtest indien georganiseerd (bijv. Aquacheck).

#### 5.5.7.4 OPVOLGING VAN AFWIJKINGEN

Indien de EC<sub>50</sub> resultaten van de positieve controles niet voldoen aan de statistische grenzen of de door MicroBiotTests aangegeven grenzen op de 'Specification sheet', of als de negatieve controle niet voldoet ( $>10\%$  immobiliteit), dan dient een analyse van de oorzaak en reikwijdte uitgevoerd te worden. Indien hieruit blijkt dat bepaalde resultaten onbetrouwbaar zijn mogen deze niet gerapporteerd worden en dient een nieuwe bemonstering te worden uitgevoerd van de geteste waters. Indien van toepassing dient ook de impact op eerder gerapporteerde resultaten te worden nagegaan.

### 5.5.8 RAPPORTERING

Het testrapport bevat:

- De identificatie van het watermonster, gegevens over monsternamen, datum van testuitvoering met monster, resultaten van meting van alle randvoorwaarden en aanpassingen, indien van toepassing.
- Verwijzing naar de betreffende WAC-methode voor ecotoxiciteit, en WAC-methode voor bepaling van fysicochemische parameters.
- Gegevens over het testorganisme (naam, herkomst, batch), motivatie voor keuze van testorganisme a.d.h.v. gemeten **geleidbaarheid** ~~randvoorwaarde~~ en type test (limiet, of verdunningsreeks).
- Resultaten:
  - Fysicochemische parameters van testoplossingen en controle op T = 0 en T = 48 u
  - % effect voor immobiliteit na (48 ± 2) u in controle en watermonster (limiettest) of
  - EC<sub>50</sub>, met methode van berekening, voor immobiliteit na (48 ± 2) u bij verdunningsreeks van het watermonster, met % effect in de hoogst geteste concentratie en grafiek voor concentratie-effect op 48 u.
- Opmerkingen en afwijkingen.

## 6 ACUTE TOXICITEIT VOOR HET PEKELKREEFTJE, ARTEMIA FRANCISCANA

### 6.1 INLEIDING

Deze test met pekelkreeftje, *Artemia fFranciscana* is het brak tot zoutwater alternatief voor een invertebraten test wanneer ~~het zoutgehalte en~~ geleidbaarheid te hoog is voor de zoetwater species (> 6700 µS/cm, zie 2).

Voor de uitvoering van deze test maakt men gebruik van een commerciële kit, de ArtoxkitM (<https://www.microbiotests.com/>), of zijn gelijkaardige varianten qua uitvoering toegestaan mits voldaan wordt aan test- en kwaliteitscriteria. Stocks van het controle medium (of dilutie medium), testrecipiënt en organismen, in de vorm van te ontluiken organismen uit droge cysten maken deel uit van de commerciële kit. De werkwijze wordt hierna verder beschreven, en voor meer informatie kan beroep gedaan worden op de handleiding bij de kit.

### 6.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Zuurstofmeter
- Thermometer en logger voor registratie min./max. temperatuur
- pH-meter voor pH meting conform WAC/III/A/005
- Geleidbaarheidsmeter voor meting geleidbaarheid conform WAC/III/A/004
- ~~Materiaal en apparatuur voor de bepaling van chloriden en sulfaten conform WAC-procedure WAC/III/C~~
- Materiaal en apparatuur voor de bepaling van ammonium
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg
- Klimaatkamer of incubator met instelbare temperatuur (25 ± 2)°C
- Lichtbron, 3000-4000 lux
- Lux meter
- Beluchting systeem (olie-vrij)
- Pipetten en toebehoren
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven en maatcilinders
- Recipiënten voor meting fysicochemische parameters

- Petriplaat met deksel ( $\phi$  5 cm) voor ontluiken van cysten
- Multiwell testplaten (24 wells) met parafilm (zie bijv. ArtoxkitM)
- Micropipetten voor transfer van testorganismen (zie bijv. ArtoxkitM)
- Tube met cysten van *Artemia fFranciscana* (zie bijv. ArtoxkitM)
- Lichttafel, vergrootglas met licht of omgekeerde microscoop (10x)

### 6.3 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Gedemineraliseerd water ( $< 10 \mu\text{S/cm}$ )
- Geconcentreerde zoutoplossingen (zie ArtoxkitM): 7 flesjes voor de bereiding van 'Standard Seawater', voor het ontluiken van cysten, en als zoutwater controle medium of verdunningswater
- HCl (0.1N) en NaOH (0.1N)
- Kaliumbichromaat, analytische kwaliteit (referentiestof, zie 6.5.7, Kwaliteitscontrole)

### 6.4 WATERMONSTER

Voor de monstername en houdbaarheid wordt verwezen naar respectievelijk WAC/I/A/003, WAC/I/A/004 en WAC/I/A/010.

Bij gebruik voor fysicochemische metingen om de randvoorwaarden te controleren wordt een gehomogeniseerd en representatief deelstaal genomen van het watermonster en op kamertemperatuur gezet.

Naast de meting van geleidbaarheid bij keuze van testorganisme (zie 2) moet eveneens pH, zuurstof, ~~chloriden, sulfaten~~ en ammonium gemeten en gerapporteerd worden. Voor de meeste van deze parameters zijn er aanvaardbare ranges gedefinieerd waarbij er geen effect verschillend van de controle ( $\leq 10\%$ ) op immobiliteit zou optreden (Tabel 4, Postma et al., 2002, gegevens MicrobBiotTests)

**Tabel 4: Randvoorwaarde voor parameters in het watermonster voor pekelkreeftje**

| Parameter                                 | pH    | Zuurstof (mg/l) | Geleidbaarheid ( $\mu\text{S/cm}$ ) | <del>Chloride (mg/l)</del> | <del>Sulfaat (mg/l)</del> | Ammonium (mg/l $\text{NH}_4^+$ ) |
|-------------------------------------------|-------|-----------------|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Pekelkreeftje, <i>Artemia franciscana</i> | 5 - 9 | $\geq 3.0$      | 2000 - 47900                        | <del>6000-18300</del>      | <del>g.d.</del>           | $< 1200$                         |

~~g.d.-geen data~~

Indien de pH van het watermonster buiten de toegelaten range valt ( $< 5$  of  $> 9$ ), dan wordt meteen de pH aangepast met zuur of base tot een pH-waarde overeenkomstig die van het zoutwater controle medium  $\pm 0.1$ .

Indien het zuurstofgehalte lager is dan 3 mg/l, dan wordt het watermonster gedurende 20 min., net voor aanvang van de test, belucht.

De aanpassingen voor pH en zuurstof worden gerapporteerd.

Indien een overschrijding van randvoorwaarde voor geleidbaarheid in het watermonster, namelijk  $> 47900 \mu\text{S/cm}$ , dan zal het watermonster getest worden bij 50% als hoogste concentratie in de limiettest met het pekelkreeftje ~~na verdunning van het watermonster met zout verdunningsmedium~~ ('Standard Seawater', zie 6.5.1). Bij het testen van een verdunningsreeks zal het watermonster zodanig verdund worden dat de hoogste concentratie van de reeks overeenkomt met een

geleidbaarheid van max. 47900  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , en van daaruit verder verdund worden om een  $\text{EC}_{50}$  af te leiden.

De metingen van ~~chloriden, sulfaten en~~ ammonium worden gerapporteerd. In geval van afwijkende randvoorwaarde voor ammonium ~~en chloriden~~ wordt er niet gecorrigeerd, maar wordt overschrijding van randvoorwaarde duidelijk vermeld in het rapport, als mogelijke parameter die bijdraagt tot gemeten toxiciteit, naast deze die te wijten zou zijn aan milieugevaarlijke stoffen.

In overleg met de opdrachtgever kan bij afwijking van ammonium alsnog een nieuwe test worden uitgevoerd door aanpassingen te doen aan het water (bijv. beluchten om ammoniak te strippen, of bufferen voor pH om ammonium/ammoniak effect uit te sluiten) gevolgd door meting van ammonium. Dergelijke aanpassingen aan het watermonster moeten gerapporteerd worden als een afwijking op de methode.

## 6.5 WERKWIJZE

### 6.5.1 ZOUTWATER MEDIUM OF VERDUNNINGSWATER

Er zijn 7 flesjes in de ArtoxkitM met geconcentreerde zoutoplossingen, om 1 l medium te maken dat qua samenstelling gedefinieerd wordt als 'Standard Seawater' (Tabel 5) met een saliniteit van 35 ppt of een geleidbaarheid<sup>2</sup> van 47.9 mS/cm.

Dit medium wordt eveneens gebruikt om de cysten te ontluiken (zie 6.5.3.1).

**Tabel 5: Geconcentreerde zoutoplossingen in ArtoxkitM**

| Flesje | Zoutoplossing                             | Hoeveelheid<br>(voor 1 liter medium) | Concentratie in bereid medium |
|--------|-------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| 1      | NaCl                                      | 26.4 g                               | 26.4 g/l                      |
| 2      | KCl                                       | 840 mg                               | 840 mg/l                      |
| 3      | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 1670 mg                              | 1670 mg/l                     |
| 4      | $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 4600 mg                              | 4600 mg/l                     |
| 5      | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 5580 mg                              | 5580 mg/l                     |
| 6      | $\text{NaHCO}_3$                          | 170 mg                               | 170 mg/l                      |
| 7      | $\text{H}_3\text{BO}_3$                   | 30 mg                                | 30 mg/l                       |

- Neem een maatkolf van 1 liter, en vul met ongeveer 800 ml gedemineraliseerd water.
- Open het flesje 1 (NaCl) en breng volledige inhoud in de 1 liter kolf. Sluit de kolf af, en schud krachtig tot het zout is opgelost.
- Open het flesje 2 (KCl) en breng over in de kolf, sluit af, krachtig schudden tot het zout is opgelost.
- Herhaal dit voor elk van de andere flesjes 3-7.
- Leng aan tot 1 liter in de maatkolf met gedemineraliseerd water, sluit af en goed mengen.
- Label de kolf, en bewaar in het donker en koel ( $5 \pm 3$ )°C tot gebruik (houdbaarheid 3 maanden).

Bij gebruik van het zoutwater medium voor het ontluiken van cysten of om verdunningen te maken, wordt het op kamertemperatuur gebracht, en wordt het gedurende 15 minuten voor gebruik belucht via doorborreling.

<sup>2</sup> Omrekening saliniteit naar geleidbaarheid bij 20°C, volgens <https://www.oceanlife.it/index.php/en/19-notizie/370-water-salinity-converter-en>, en resultaat in lijn met annex in NBN EN ISO 5814



## 6.5.2 TESTORGANISMEN

De acute toxiciteitstest met het pekelkreeftje wordt gestart met instar II-III larven, nl. organismen **bekomen uit cysten na 30u ontluikingsperiode jonger dan 24 u die ontluiken uit cysten.**

### 6.5.2.1 ONTLUIKEN VAN CYSTEN

In de ArtoxkitM is er een tube voorzien met cysten. Het ontluiken van de cysten wordt gestart 30 u voor aanvang van de toxiciteitstest.

- **Doe 10 ml van het beluchte zoutwater medium in de petriplaat.**
- Giet de inhoud van het buisje met cysten in de petriplaat, en controleer dat alle cysten uit de tube zijn overgebracht. **Meng voorzichtig voor een gelijkmatige verdeling van de cysten in het zoutwatermedium.**
- ~~Doe 10 ml van het beluchte zoutwater medium in de petriplaat, en meng voorzichtig voor een gelijkmatige verdeling van de cysten.~~
- Dek de petriplaat af, en plaats gedurende 30 u, bij 25°C **(temperatuur in het water)** onder continue belichting van 3000-4000 lux.
- Bij optimale omstandigheden van licht en temperatuur zullen de cysten ontluiken rond 18 - 20 u incuberen, en na 30 u zullen de meeste larven in het instar II-III stadium zijn voor gebruik in de test.

## 6.5.3 TESTOPLOSSINGEN VAN HET WATERMONSTER

Het watermonster wordt op kamertemperatuur gebracht, en goed gehomogeniseerd door schudden voor gebruik. De testoplossingen worden vers bereid tot maximum 4 uur voor aanvang van de test. Het zoutwater medium wordt gebruikt als controle conditie (zie Tabel 6), en wordt eveneens gebruikt voor verdunningen van het watermonster indien een test met verdunningsreeks vereist is.

Voor elk van de testoplossingen wordt voldoende testoplossing, minstens 40 ml gemaakt. Per testconditie zijn er 4 replica's nodig, zowel voor de limiettest als bij een verdunningsreeks, met elk 1 ml testoplossing, en 1 spoel-well met 1 ml testoplossing voor de transfer van de organismen, terwijl 25 ml testoplossing nodig is voor meting van fysicochemische parameters.

### 6.5.3.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

Het water wordt standaard in een limiettest geëvalueerd als onverdund water (hoogste testconcentratie of 100% water) in vergelijking met een controle conditie (zoutwater medium), tenzij de randvoorwaarde voor geleidbaarheid overschreden is en men als hoogste concentratie bij 50% watermonster moet testen (zie **6.4 5.4**).

### 6.5.3.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC<sub>50</sub> BEPALING

Indien van toepassing (bijv. volgens bijzondere voorwaarde in vergunning van het bedrijf) moet het water in een verdunningsreeks getest worden om een EC<sub>50</sub> waarde te bepalen. Hiervoor wordt het water verdund met het zoute verdunningswater (zie 6.5.1), voor minstens 5 concentraties met bijv. verdunningsfactor 2, in vergelijking met controle (zoutwater medium). De hoogste testconcentratie van het watermonster moet een geleidbaarheid hebben  $\leq 47900 \mu\text{S}/\text{cm}$ .

Uitzonderlijk is een range finding test nodig, bijv. indien zeer hoge toxiciteit verwacht wordt. Hierbij wordt een verdunningsreeks opgezet met hogere verdunningsfactor, bijv. 10 om de 0 - 100% effectrange te vinden. Uit deze test wordt de verfijnde testrange (met lagere verdunningsfactor, minimum 2) afgeleid met concentraties van water waarbij minstens 1 punt met 100% effect en een punt met een effect  $\leq 10\%$ , en met indien mogelijk meerdere punten op de helling van de



concentratie-effect curve om een nauwkeurige EC<sub>50</sub> waarde te berekenen. Indien er weinig tot geen effect is (< 50% acute toxiciteit), kan er geen EC<sub>50</sub> waarde bepaald worden.

#### 6.5.4 BLOOTSTELLING

##### 6.5.4.1 BLOOTSTELLINGSCONDIITIES

- Duur: (24 ± 2) u
- Licht-donker cyclus: continu volledige duisternis
- Temperatuur: (25 ± 2)°C tijdens blootstelling. Via een temperatuurlogger in een testbeker (25 ml testvloeistof) naast de testrecipiënten wordt de temperatuur opgevolgd gedurende de blootstellingsperiode. Gedurende de test mag het temperatuurverschil niet meer dan 2°C bedragen.
- Testrecipiënt: well plaat zoals voorzien in de ArtoxkitM, 4 x 6 wells waarvan 4 (limiet) of 3 (verdunningsreeks) replica wells per testconditie, en een afzonderlijke well per testconditie te voorzien voor de transfer. Er is in de kit parafilm voorzien om de plaat af te dekken tijdens de incubatie.
- Testvolume: 1 ml per replica, en 10 larven per replica van een testconditie, nl. controle of concentratie(s) van watermonster. Dit is hetzelfde in de limiettest en bij een verdunningsreeks. Er wordt een afzonderlijke beker met 25 ml testvloeistof geïncubeerd voor meting van fysicochemische parameters voor controle en hoogste concentratie watermonster.
- Replica's: 4 voor controle en 4 voor hoogste concentratie water in de limiettest, en 3 4 per testconditie bij een verdunningsreeks.

##### 6.5.4.2 TRANSFER LARVEN NAAR TESTOPLOSSINGEN

- Voorzie het nodige aantal instar II-III larven (leeftijd < 24 u) na ontluiken van cysten en voorzie hulpmiddel (bv. Lichttafel met vergrootglas of omgekeerde microscoop) en een micropipet voor de transfer. Neem de petriplaat met ontloken larven uit de incubator.
- Vul testrecipiënten (wells) met 1 ml water of zoutwater controle medium.
- Voorzie voor elk van de verschillende testcondities, 1 gevulde well voor de transfer van de larven (= spoelrecipiënt).
- Breng minstens 50 larven uit de petriplaat over met een micropipet naar het spoelrecipiënt voor elk van de testoplossingen, te beginnen met de controle, en dan oplopende concentratie van water. Probeer om vloeistof overdracht bij transfer van larven te beperken.
- Neem een zuivere micropipet, en breng nu telkens 10 larven uit het spoelrecipiënt naar elk van de 4 replica wells per testconditie. Controleer de aantallen per well door de larven te tellen bij het verlaten van de micropipet. Doe deze handeling voor elk van de condities, te beginnen met de controle, en vervolgens met oplopende concentratie water.
- Controleer organismen in elk van de testcondities en registreer op laboformulier de gegevens van blootstelling en testorganismen. De testplaat wordt afgedekt met parafilm en weggezet bij (25 ± 2)°C in het donker om (24 ± 2) u blootstelling te starten.
- Zet voor de controle en hoogste testconcentratie water een beker met testoplossing (25 ml) in de incubator voor metingen na (24 ± 2) u. Gebruik deze beker eveneens voor de temperatuurlogger om min. en max. temperatuur te registreren.

De resterende testoplossingen zullen gebruikt worden voor meting van pH en zuurstof bij start van de test. Uitsluitend in de controle conditie, en in de hoogste testconcentratie, zowel voor de limiettest als bij de test met verdunningsreeks moet er gemeten worden.

### 6.5.5 EVALUATIE VAN TEST

- Zowel in de limiettest als bij een verdunningsreeks wordt het resultaat na  $(24 \pm 2)$  u afgelezen.
- De wells worden geëvalueerd met een omgekeerde microscoop (of vergrootglas boven lichtbak) voor het aantal immobiele organismen in elk van de replica's van elke testconditie, en overeenkomstig geregistreerd. Larven die niet meer zwemmen, of bewegen gedurende 10 sec van observatie worden als immobiel of dood gescoord.
- De testvloeistof in de afzonderlijke beker wordt gebruikt voor pH en zuurstof metingen na 24 u. Dit is enkel nodig voor de controle conditie en de hoogste concentratie van het geteste watermonster, zowel in de limiettest, als test met verdunningsreeks.
- De temperatuurregistraties tijdens het verloop van de test worden afgelezen, en minimum- en maximumtemperatuur tijdens  $(24 \pm 2)$  u blootstelling worden gerapporteerd.
- Verwijder de testorganismen en de testoplossingen als chemisch afval.

### 6.5.6 BEREKENING VAN RESULTAAT VOOR ACUTE TOXICITEIT NA 24 U

#### 6.5.6.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

De aflezing van het aantal immobiele larven op  $(24 \pm 2)$  u, gesommeerd voor de 4 replica's resulteert in een cumulatief aantal immobiele larven, ten opzichte van het totaal mobiele larven ( $n = 40$ ) bij aanvang van de test. Het resultaat wordt omgerekend in % van organismen met een effect (immobiel) voor de hoogst geteste concentratie van het water (onverdund) en voor de controle conditie.

#### 6.5.6.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSRREEKS VOOR $EC_{50}$ BEPALING

- Voor elke concentratie watermonster en voor de controle wordt het cumulatief aantal immobiele organismen berekend en uitgedrukt als % effect na 24 u blootstelling. Dit is naar analogie met de limiettest.
- De resultaten van % effect (Y-as) worden grafisch voorgesteld als functie van de concentratie (% verdunning) van het watermonster (X-as). Mits een goede concentratie-effect relatie kan er ook een  $EC_{50}$  waarde berekend worden.
- Een  $EC_{50}$  waarde kan afgeleid of berekend worden op verschillende manieren (grafische interpolatie of statistische methode, als probit analyse). Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge concentratieverhouding van 2 respectievelijk 0 en 100% effect veroorzaken, is het voldoende de  $EC_{50}$  te situeren tussen deze beide concentraties.

### 6.5.7 KWALITEITSCONTROLE

#### 6.5.7.1 EERSTELIJNSCONTROLE

##### ***Beslissingscriterium voor geldigheid van de test:***

- De immobiliteit in de controlegroep moet op het einde van de test voldoen aan  $\leq 10\%$ . De waarde(n) voor immobiliteit in de controlegroep moeten bijgehouden worden in een limietkaart.
- De variatie tussen ~~respectievelijke de 10~~ replica's per testconditie moet minder zijn dan 5 organismen, en dit voor alle testcondities van een watermonster.

**Herkomst en kwaliteit van testorganismen:**

Bij het gebruik van cysten uit de ArtoxkitM wordt steeds het batchnummer op het laboformulier vermeld. De gegevens over de gevoeligheid van elke gebruikte batch in de vorm van een  $EC_{50}$  voor referentiestof, uitgevoerd door MicrobBiotTests worden bijgehouden in een databestand.

**6.5.7.2 TWEDELIJNSCONTROLE**

De methode toegepast in het labo wordt op de hieronder vermelde frequenties uitgevoerd met een positieve controle (Kaliumbichromaat) waarvoor de  $EC_{50}$  bepaald wordt na  $(24 \pm 2)$  u voor een dilutiereeks van 100 tot 10 mg/l (voor details zie handleiding ArtoxkitM):

- De  $EC_{50}$  wordt geregistreerd in een statistische controlekaart, naast deze van de corresponderende batch voor de ArtoxkitM.
- De minimale frequentie voor een test met positieve controle is als volgt:
  - Bij wekelijkse uitvoering van de test: driemaandelijks positieve controle testen
  - Bij maandelijkse uitvoering: zesmaandelijks een positieve controle test
  - Bovendien zal ieder van de betrokken uitvoerders minstens 1 maal per jaar een test met positieve controle uitvoeren.

**6.5.7.3 DERDELIJNSCONTROLE**

Minstens 1x per jaar deelnemen aan een externe ringtest, indien georganiseerd.

**6.5.7.4 OPVOLGING VAN AFWIJINGEN**

Indien de  $EC_{50}$  resultaten van de positieve controle niet voldoen aan de statistische grenzen of de door MicrobBiotTests aangegeven grenzen op de 'Specification sheet' van de batch cysten, of als de negatieve controle niet voldoet ( $>10\%$  immobiliteit), dan dient een analyse van de oorzaak en reikwijdte uitgevoerd te worden. Indien hieruit blijkt dat bepaalde resultaten onbetrouwbaar zijn mogen deze niet gerapporteerd worden en dient een nieuwe bemonstering te worden uitgevoerd van de geteste waters. Indien van toepassing dient ook de impact op eerder gerapporteerde resultaten te worden nagegaan.

**6.5.8 RAPPORTERING**

Het testrapport bevat:

- De identificatie van het watermonster, gegevens over monsternamen, datum van testuitvoering met monster, resultaten van meting van al de randvoorwaarden en aanpassingen, indien van toepassing.
- Verwijzing naar de betreffende WAC-methode voor ecotoxiciteit, en WAC-methode voor bepaling van fysicochemische parameters.
- Gegevens over het testorganisme (naam, herkomst, batch), motivatie voor keuze van testorganisme a.d.h.v. gemeten randvoorwaarde en type test (limiet, of verdunningsreeks)
- Resultaten:
  - Fysicochemische metingen in testoplossingen en controle op  $T=0$  en  $T=24$  u
  - % effect voor immobiliteit na  $(24 \pm 2)$  u in controle en watermonster (limiettest) of
  - $EC_{50}$ , met methode van berekening, voor immobiliteit na  $(24 \pm 2)$  u bij verdunningsreeks van watermonster, met % effect in de hoogst geteste concentratie van het watermonster, en grafiek voor concentratie-effect op 24u
- Opmerkingen en afwijkingen.

## 7 REFERENTIES

- NBN EN ISO 6341 (2012). Waterkwaliteit - Bepaling van de remming van de mobiliteit van *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxiciteitsproef.
- OECD202 (2004). OECD guideline for testing of chemicals. *Daphnia* sp., Acute immobilization test.
- Handleidingen van de testkits DaphtoxkitF en ArtoxkitM.
- Postma J.F., De Valk S., Dubbeldam M., Maas J.L., Tonkes M., Schipper C.A. & B. J. Kater (2002). Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicology and environmental safety* 53, 226-237.

**BIJLAGE A: LABOCULTUUR VAN WATERVLO, *DAPHNIA MAGNA*****A.1 Kweek van watervlooien**

Testorganismen voor de acute test zijn neonaten (jongen <24u), afkomstig van een kweek van watervlooien, soort *Daphnia magna Straus* (Cladocera, Brachiopoda, Crustacea), zoals hierna summier beschreven.

Een stock cultuur met 25-50 organismen per liter medium wordt opgezet. De watervlooien 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.

Ze worden gekweekt op een rijk kweekmedium (bijv. Elendt M4), waarvoor we verwijzen we Annex A van ISO-richtlijn 6341 (2012). De voeding bestaat uit een suspensie van algen en tetramin. De moederdieren worden gebruikt in de kweek tot ze 6 weken oud zijn. Ondertussen zorgt men voor nieuwe kweekdieren. Als de oudere moederdieren  $\pm 30$  dagen oud zijn worden met jonge watervlooien nieuwe kweekpotten opgestart, die afgescheiden worden via zeven. In geval een nieuwe kweek werd opgestart, worden vanaf  $\pm 7$  dagen de eerste jongen geboren. Deze jongen worden niet gebruikt voor de testen. De jongen vanaf de 2<sup>de</sup> week van de kweek kunnen gebruikt worden om testen uit te voeren.

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 dag van start van de test in het compartiment zwemmen, zijn neonaten van maximaal 24 uur oud die geschikt zijn voor gebruik in de test.

**BIJLAGE B: CONTROLE EN VERDUNNINGSMEDIUM VOOR WATERVLO TEST****B.1 Bereiding stockoplossingen**

Voor de bereiding van 4 stockoplossingen met zouten worden reagentia met gekende analytische zuiverheid gebruikt.

- Calciumchloride: los 11.76 g calciumchloride dihydraat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.
- Magnesiumsulfaat: los 4.93 g magnesiumsulfaat heptahydraat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.
- Natriumbicarbonaat: los 2.59 g natriumbicarbonaat ( $\text{NaHCO}_3$ ) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.
- Kaliumchloride: los 0.23 g kaliumchloride (KCl) op in gedemineraliseerd water en leng aan tot 1 liter in een maatkolf.

Deze oplossingen worden gelabeld en gedateerd, en kunnen gedurende 6 maanden donker en koel ( $5 \pm 3$ )°C bewaard worden.

**B.2 Bereiding van verdunningsmedium**

Elk van de 4 stockoplossingen wordt gebruikt bij een 1:40 verdunning. Een 1 liter maatkolf wordt ongeveer half gevuld met gedemineraliseerd water, en vervolgens wordt 25 ml van elk van de 4 stocks in de maatkolf toegevoegd, waarna er aangelengd wordt tot 1 liter met gedemineraliseerd water.

Deze oplossing wordt belucht tot zuurstofverzadiging en stabiele pH. Vervolgens wordt de pH gecontroleerd en als nodig bijgesteld met NaOH of HCl tot  $\text{pH } 7.8 \pm 0.5$ .

Het medium is gereed voor gebruik of kan koel ( $5 \pm 3$ )°C en donker bewaard worden gedurende maximum 3 maanden. De samenstelling van het medium staat in volgende tabel, en is conform het ISO 6341 standaardmedium.

**Tabel 6: samenstelling van controle- en verdunningsmedium in de watervlo test**

| Zout                                      | Concentratie (mg/l) |
|-------------------------------------------|---------------------|
| $\text{NaHCO}_3$                          | 64.8                |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 294                 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 123.3               |
| KCl                                       | 5.8                 |