Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

Ecotoxiciteitstest met algen: groei-inhibitietest met de zoetwateralg (Pseudokirchneriella subcapitata) of de mariene alg (Phaeodactylum tricornutum)

INHOUD

1 Toepassingsgebied 4

2 Keuze van testorganisme 4

3 Principe van de test 5

3.1 Groei-inhibitie als eindpunt voor toxiciteit bij algen 5

3.2 Limiettest 5

3.3 Verdunningsreeks 5

4 Definities 6

5 Groei-inhibitie test met de zoetwateralg, Pseudokirchneriella subcapitata 6

5.1 Inleiding 6

5.2 Apparatuur en materiaal 7

5.3 Reagentia en oplossingen 8

5.4 Watermonster 8

5.5 Werkwijze 9

5.5.1 Algengroeimedium (controle) of verdunningswater 9
5.5.2 Testorganismen 10
5.5.3 Testoplossingen van watermonsters 11
5.5.4 Blootstelling 13
5.5.5 Evaluatie van test 13
5.5.6 Berekening van resultaat voor groei-inhibitie na 72 u 14
5.5.7 Kwaliteitscontrole 16
5.5.8 Rapportering 17

6 Groei-inhibitie test met de zoutwateralg, Phaeodactylum tricornutum 18

6.1 Inleiding 18

6.2 Apparatuur en materiaal 19

6.3 Reagentia en oplossingen 19

6.4 Watermonster 19

6.5 Werkwijze 21

6.5.1 Zoutwateralgengroeimedium (controle) of verdunningswater 21
6.5.2 Testorganismen 22
6.5.3 Testoplossingen van watermonster 23
6.5.4 Blootstelling 27
6.5.5 Evaluatie van test 28
6.5.6 Berekening van resultaat voor groei-inhibitie na 72 u 28
6.5.7 Kwaliteitscontrole 30
6.5.8 Rapportering 31

7 REFERENTIES 31

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025
http://www.emis.vito.be
emis

BIJLAGE A : Labocultuur van algen, en bereiden van precultuur _____ 32

A.1 Kweek van algen 32

A.2 Opzetten van precultuur 32

BIJLAGE B : Algengroeimedium (Controle) en verdunningswater voor de zoetwateralgen test__ 33

B.1 Bereiding van stockoplossingen van nutriënten 33

B.2 Bereiding van zoetwateralgengroeimedium, of verdunningsmedium 33

BIJLAGE C : Algengroeimedium (Controle) en verdunningswater voor de zoutwateralgen test__ 34

C.1 Bereiding synthetisch zoutwater 34

C.2 Bereiding stockoplossing van nutriënten en verdunningen voor bereiding van zoutwateralgenmedium 34

C.3 Bereiding van zoutwateralgenmedium, of verdunningswater 34

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

emis

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de werkwijze om de acute en chronische toxiciteit voor 2 soorten van ééncellige algen te bepalen. Deze test wordt als een chronische test beschouwd omdat de generatietijd korter is dan de blootstellingsduur. De test op algen wordt gebruikt om de toxiciteit voor het trofische niveau van de primaire producenten te meten.

De procedure is van toepassing voor

- Diverse waterige milieumatrices: afval-, oppervlakte-, drink- en grondwater.
- Waterige oplossingen met chemische stoffen (zoals deze voor de 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 algen test op waters wordt standaard uitgevoerd met het zoetwaterorganisme *Pseudokirchneriella subcapitata,* een ééncellig groenwier of alg.

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 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 ~~en~~ een goede maat is voor de totale ionensterkte van de aanwezige zouten, waarvan chloriden en sulfaten de belangrijkste zijn. Indien de fysicochemische parameter geleidbaarheid voor de zoetwateralg overschreden is, dan zal men voor de algen test het zoutwaterorganisme *Phaeodactylum tricornutum* kiezen.

2 KEUZE VAN TESTORGANISME

Voor de juiste keuze van het testorganisme is meting van geleidbaarheid in het watermonster een vereiste.
De meting van geleidbaarheid wordt getoetst aan de randvoorwaarde voor de zoetwateralg, *Pseudokirchneriella subcapitata* (**Tabel 1**, Postma et al., 2002). Bij een overschrijding van de geleidbaarheid moet gekozen worden voor de zoutwateralg, *Phaeodactylum tricornutum* (zie 6).
De meetresultaten voor deze randvoorwaarde wordt gedateerd en gerapporteerd, ter motivatie voor de keuze van het testorganisme.

Tabel 1: Randvoorwaarde geleidbaarheid voor de zoetwateralg

Parameter	Geleidbaarheid (µS/cm)
Zoetwateralg, *Pseudokirchneriella subcapitata*	≤ 3300

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025
http://www.emis.vito.be

3 PRINCIPE VAN DE TEST

3.1 GROEI-INHIBITIE ALS EINDPUNT VOOR TOXICITEIT BIJ ALGEN

Exponentieel groeiende culturen van ééncellige algen worden blootgesteld aan het monster gedurende verschillende generaties over een periode van 3 dagen of 72 u, in gestandaardiseerde omstandigheden, en dit in vergelijking met een controle medium. De groei van de alg is de som van een aantal cellulaire en metabole processen. Het effect van een voor algen schadelijk watermonster vertaalt zich in een verminderde 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 24 u, of enkel na 72 u) en uitgedrukt als % effect.

3.2 LIMIETTEST

Voor het meten van de toxiciteit van waters wordt standaard een limiettest uitgevoerd op de hoogst mogelijke concentratie van het watermonster (~97%)[1]. Voor de alg wordt het % effect enkel na 72 u blootstelling aan 1 testconditie gemeten, relatief ten opzichte van de optimale groei in controle medium en resultaten voor inhibitie van groeisnelheid worden gerapporteerd.
Voor de zoutwateralg is 1 testconditie in de limiettest niet voldoende vanwege de range geleidbaarheid (randvoorwaarde) en de verschillende zouten die nodig zijn voor groeicondities. Een protocol met 3 testcondities in vergelijking met controle wordt beschreven (zie 6.5.3.1).

3.3 VERDUNNINGSREEKS

Uitzonderlijk worden de testen uitgevoerd op een verdunningsreeks van het water. 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 water (of de referentiestof) in een reeks van minstens 5 concentraties getest, bijvoorbeeld een 1:1 verdunning uitgaande van de hoogst mogelijke concentratie water (~97%), naast de controle conditie. De concentratiereeks van het water of de referentiestof wordt best zodanig gekozen dat de hoogste concentratie ongeveer 100% effect oplevert, en de laagste concentratie 0% effect (of niet significant verschillend van de controle) door bijv. de verdunningsfactor aan te passen. Dit laat toe een grafiek met concentratie-effect voor vermindering van biomassa en groeisnelheid te genereren, alsook een EC_{50}-waarde te berekenen die de concentratie van het water of referentiestof geeft waarbij 50% groei-inhibitie optreedt. Bij deze test met een verdunningsreeks kan eveneens het % effect, zoals in de limiettest, bepaald worden voor de hoogste testconcentratie van het water van de reeks na 72 u blootstelling.

[1] In de limiettest wordt de hoogst mogelijke concentratie van afvalwater getest. Voor de algen test is 100% watermonster niet mogelijk, vermits essentiële nutriënten en inoculum van algen worden toegevoegd, zodanig dat de hoogste testconcentratie steeds iets lager is dan 100%: zie 5.5.3.1 en 6.5.3.1

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

4 DEFINITIES

- Biomassa: de hoeveelheid biologisch materiaal per volume, in dit geval uitgedrukt in celconcentratie (eventueel omgerekend vanuit of uitgedrukt in een equivalent signaal als fluorescentie eenheden of optische densiteit, OD bij spectrofotometrische bepaling).
- Biomassa equivalent: wanneer de celconcentratie niet rechtstreeks gemeten wordt door telling, maar indirect via fluorescentie of UV/VIS-spectrometrie, dan kan dat signaal als biomassa equivalent worden beschouwd.
- Celconcentratie: is het aantal cellen, of beter algen, per ml.
- Groei: toename van de biomassa gedurende de testperiode.
- Groeisnelheid: toename van de biomassa per tijdseenheid.
- Limiettest: in de test wordt 1 concentratie van het water (nl. de hoogste concentratie of het onverdunde water) geëvalueerd in vergelijking met controle medium.
- EC_{50}: de concentratie water of chemische stof die leidt tot een vermindering met 50% van de biomassa, E_bC_{50}, of van de groeisnelheid (rate) E_rC_{50} ten opzichte van de controle.
- Randvoorwaarden: voor het testmonster geldende grenzen voor fysicochemische parameters, zoals pH, O_2, 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 (ook positieve controle).
- Toxiciteit identificatie en evaluatie (TIE): onderzoek naar de oorzaken van toxiciteit door waters 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 GROEI-INHIBITIE TEST MET DE ZOETWATERALG, PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA

5.1 INLEIDING

De uitvoering van de groei-inhibitietest voor de zoetwateralg is gebaseerd op internationale richtlijnen, OECD 201 (2011) en ISO 8692 (2012).
De beschrijving in deze WAC-procedure is gebaseerd op uitvoering met de AlgtoxkitF, een commerciële kit (https://www.microbiotests.com/). Stocks van het controle medium (of dilutie medium), test- en meetrecipiënt en algen zijn aanwezig in de kit, of kunnen afzonderlijk aangekocht worden. De algen worden aangeboden in de vorm van 'beads' of parels, waarbij de algen geïmmobiliseerd zijn in een inerte matrix en tot 5-maanden in de koelkast bij (5 ± 3)°C bewaard kunnen blijven. Bij de testkit worden spectrofotometrische cuvetten met een weglengte van 10 cm aangeboden, met een afdekplaat, die tegelijk als testrecipiënt en meetcel fungeren.

Qua uitvoering zijn er evenwel een aantal varianten qua meetmethode, testrecipiënten, startcultuur van algen mogelijk, mits aan bepaalde voorwaarden is voldaan.

- Voor deze test is het ook toegestaan gebruik te maken van algen uit een continue cultuur in het labo, mits deze gezond is door wekelijkse passage op een rijk algenmedium. De algencultuur wordt onderhouden in steriele 250 ml glazen erlenmeyers met lucht-doorlaatbare stoppen in temperatuur- en licht gecontroleerde omstandigheden. Een

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

precultuur wordt gemaakt 2-4 dagen voor start van de toxiciteitstest (specificaties: zie BIJLAGE A).

- De bereiding van controle medium (en dilutie medium) is mogelijk vertrekkende van reagentia van analytische kwaliteit. Een werkwijze voor de bereiding en de samenstelling van het medium is te vinden in BIJLAGE B.
- De biomassa of concentratie van algen wordt klassiek bepaald met een deeltjesteller (voor sferische deeltjes in range 2.5 - 25 µm), of via microscopische evaluatie met telkamer. Alternatieve meetmethoden, zoals fluorescentie (excitatie 465 nm, emissie 670 nm) of spectrometrie (670 nm) zijn indirecte methoden die mits voldoende gevoelig en mits een correlatie tussen het signaal en algenconcentratie is aangetoond, ook gebruikt kunnen worden om groei te meten als biomassa equivalent. De AlgtoxkitF meet biomassa via spectrofotometrische analyse, die voldoende gevoelig is door het gebruik van meetcuvetten met een weglengte van 10 cm. Verder wordt er bij elke testkit en overeenkomstige batch van algen een werkblad geleverd met de correlatie tussen het OD-signaal voor spectrofotometrie met de 10 cm cuvetten en het aantal algen. De regressievergelijking wordt gebruikt bij de berekening van de resultaten om het gemeten OD-signaal uit te drukken als aantal cellen/ml.
- De klassieke test, beschreven door OECD 201 en ISO 8692, maakt gebruik van steriele, glazen erlenmeyers (100 of 250 ml) met luchtdoorlaatbare stoppen als testrecipiënt. Gelijkaardig materiaal, als steriele wegwerp celcultuurflessen zijn een valabel alternatief alsook multiwell platen of de 10 cm cuvetten in de AlgtoxkitF. Het materiaal en de geometrie van de testrecipiënten moet zodanig zijn dat uitwisseling van gassen naar de lucht door groei van algen mogelijk is, terwijl verlies en evaporatie van potentieel toxische stoffen vermeden wordt (zie ook Annex A en B in ISO 8692). De gekozen testrecipiënten moeten zodanig zijn dat aan de geldigheidscriteria voor de test met algen voldaan wordt (zie 5.5.7.1).

5.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 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 ammonium en hardheid.
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg.
- Algenincubator, of klimaatkamer met lichtbron, instelbare temperatuur (23 ± 2)°C en schudtoestel (tenzij de algen minstens dagelijks geresuspendeerd worden via manueel schudden, zoals van toepassing bij de AlgaltoxkitF).
- Lichtbron, 3000-4000 Lux voor onderlangse verlichting, 10000 Lux voor zijdelingse verlichting.
- Lux meter
- Vortex
- Labocentrifuge en tubes 10-15 ml, 3000 rpm.
- Pipetten en toebehoren.
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven, maatcilinders voor bereiding van testoplossingen en verdunningen.
- Recipiënten voor meting van fysicochemische parameters.
- Tube met algenbeads van zoetwateralg, *Pseudokirchneriella subcapitata* (zie AlgaltoxkitF), met een specificatie sheet met batch nummer van het inoculum, houdbaarheidsdatum, E_bC_{50} & E_rC_{50} waarden van Kaliumbichromaat voor de batch, en een sheet met regressievergelijking van optische densiteit (OD) versus aantal algen (N) voor de batch algenbeads, of organismen uit eigen kweek (zie BIJLAGE A).

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

- Polystyreen long cells of cuvetten (10 cm), met afdekplaatje, geplaatst in verzamelbak te gebruiken als testrecipiënten (zie AlgaltoxkitF), en 2 polystyreen long cells, met afdekplaatje voor 0-calibratie van spectrometer, en meten van OD in geconcentreerde algenstock.
- Spectrofotometer, met meetcel geschikt voor cuvetten van 10 cm weglengte[2].

5.3 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Gedemineraliseerd water (< 10 µS/cm).
- Flesje met speciaal medium 'Matrix dissolving medium', om matrix bij algenbeads te verwijderen.
- 5 flesjes met geconcentreerde zoutoplossingen voor algenmedium (zie AlgaltoxkitF) of de nodige zouten van analytische kwaliteit, zoals in Tabel 5 (zie BIJLAGE B) voor de bereiding van controle medium en verdunningsmedium.
- 1N HCl en 1N NaOH voor pH aanpassing van groeimedium, of van watermonster.
- Kaliumbichromaat, analytische kwaliteit (referentiestof, zie 5.5.7, Kwaliteitscontrole).

5.4 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) moeten eveneens pH, hardheid en ammonium gemeten en gerapporteerd worden. Voor de meeste van deze parameters zijn er aanvaardbare ranges gedefinieerd waarbij er geen effect op groei zal optreden (Tabel 2, Postma et al., 2002)

Tabel 2: Randvoorwaarde voor fysicochemische parameters voor zoetwateralg.

Parameter	pH	Zuurstof (mg/l)	Geleidbaarheid (µS/cm)	Hardheid (mg/l $CaCO_3$)	Ammonium (mg/l NH4+, bij pH 8[3])
Zoetwateralg, *Pseudokirchneriella subcapitata*	7 - 9	Niet relevant	≤ 3300	< 1000	< 25

Indien de pH van het watermonster buiten de toegelaten range valt (< 7 of > 9), dan wordt meteen de pH aangepast met zuur of base tot een pH-waarde overeenkomstig die van het controle medium ± 0.1. De aanpassing van pH wordt gerapporteerd.

De metingen van hardheid en ammonium worden gerapporteerd. In geval van afwijkende randvoorwaarden voor ammonium en hardheid wordt er niet gecorrigeerd, maar wordt overschrijding van randvoorwaarden duidelijk vermeld worden in het rapport, als mogelijke

[2] Andere meetinstrumenten voor fluorescentie of deeltjesteller om aantal algen in testoplossing te kwantificeren zijn mogelijk.

[3] Randvoorwaarde ammonium bij pH> 8 kan lager zijn vanwege hogere toxiciteit, maar data ontbreken.

http://www.emis.vito.be

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

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 (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.

Naast de randvoorwaarden zijn er, specifiek voor de algentest, mogelijke interferenties op de meting van de algen (meest uitgesproken bij de spectrofotometrische analyse) wanneer er veel zwevend stof is, en wanneer het water gekleurd of troebel is. De methode met de AlgaltoxkitF voorziet bij de spectrofotometrische meting een correctie voor kleur en turbiditeit (zie 5.5.4. Blootstelling), die men steeds moet toepassen voor milieumatrices. De eventuele aanwezigheid van turbiditeit of kleur in het watermonster wordt gerapporteerd.

Indien er echter aanwijzingen zijn dat de methode met correctie geen betrouwbare resultaten geeft dan kan in overleg met de opdrachtgever de test opnieuw worden uitgevoerd nadat men het watermonster gaat behandelen, bijv. centrifugeren om overmaat zwevend stof te verwijderen of filtreren om steriel te maken en groei van micro-organismen die turbiditeit kunnen verhogen tijdens de incubatie uit te sluiten. Bij de rapportering moeten dergelijke behandelingen gemeld worden als een afwijking op de methode.

5.5 WERKWIJZE

5.5.1 ALGENGROEIMEDIUM (CONTROLE) OF VERDUNNINGSWATER

Er zijn 4 flesjes in de AlgaltoxkitF met geconcentreerde zoutoplossingen, genaamd Nutriënt stock A, B, C & D (overeenkomstig de stockoplossingen 1,2,3 & 4 in het ISO-medium, zie tabel in BIJLAGE B) om groeimedium voor algencultuur te maken. Dit medium wordt zowel gebruikt om de precultuur van de algenbeads op te starten (zie 5.5.2.1), alsook voor verdunningsmedium van het watermonster in de test (zie 5.5.3) of als controle conditie in de test.

- Neem een maatkolf van 1 liter, en vul met ongeveer 800 ml gedemineraliseerd water.
- Open het flesje ‘Nutriënt stock A’ en breng 10 ml in de 1 liter kolf.
- Open achtereenvolgens flesjes ‘Nutriënt stock B, C en D’ en voeg van elk van deze flesjes, telkens 1 ml in de kolf.
- Leng aan tot 1 liter in de maatkolf met gedemineraliseerd water, sluit af en goed mengen.
- Label de kolf, en bewaar overnacht in het donker of doorborrel gedurende 30 min. voor evenwicht instelling.
- Voor gebruik als medium, en na evenwicht instelling wordt de pH gecontroleerd en bijgesteld indien nodig tot pH 8.1 ~~7.5~~ ± 0.2, gebruik makend van 1N HCl of 1N NaOH.
- Het medium kan donker en koel (5 ± 3)°C bewaard worden gedurende max. 1 maand.

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

5.5.2 TESTORGANISMEN

Voor deze test maakt men gebruik van een snelgroeiende soort van ééncellige groene algen, *Pseudokirchneriella subcapitata.* Deze zoetwateralg kan in het labo aanwezig zijn als een continue cultuur, van waaruit voor de test een precultuur wordt gestart (zie BIJLAGE A).
Hierna beschrijven we het gebruik van algenbeads uit de AlgtoxkitF om een inoculum te bereiden geschikt voor de opzet van een toxiciteitstest, zodat een continue cultuur niet vereist is.

5.5.2.1 DE-IMMOBILISATIE VAN ZOETWATERALGEN UIT DE ALGENBEADS

- Neem een tube met algenbeads uit de kit, en giet voorzichtig bovenstaande vloeistof (bewaarmedium) af en verifieer of al de beads in de tube blijven.
- Neem het flesje 'Matrix dissolving medium', en pipetteer 5 ml in de tube met de algenbeads.
- Sluit de tube, en schud handmatig totdat de matrix rond de algen volledig is opgelost. Dit moet lukken in 5 à 10 min. Eventueel mag een vortex gebruikt worden om het proces te versnellen.
- Centrifugeer, 10 min. bij 3000 rpm.
- Giet de bovenstaande vloeistof af, en vervang met 10 ml gedemineraliseerd water.
- Sluit de tube, schud krachtig om een homogene algensuspensie te bekomen.
- Centrifugeer 10 min. bij 3000 rpm.
- Giet de bovenstaande vloeistof af, en vervang met 10 ml algengroeimedium.
- De tube is gereed voor bereiding van het geconcentreerde algeninoculum (zie 5.5.2.3).

5.5.2.2 METING VAN OPTISCHE DENSITEIT VAN ALGENSUSPENSIE VIA SPECTROMETRIE: AANDACHTSPUNTEN!

Metingen van optische densiteit (OD) zijn de maat voor hoeveelheid algen in suspensie na spectrofotometrische meting bij 670 nm, gebruik makend van de wegwerp cuvetten met weglengte 10 cm (long cells). Voor elke tube algenbeads is er een specificatie sheet met batch nummer, en overeenkomstig een sheet met de regressievergelijking voor de relatie OD en aantal algen. Indien men een andere meetmethode (of toestel) gebruikt voor het kwantificeren van algen is het nodig om het gemeten signaal (bijv. OD-meting, of fluorescentiemeting) te controleren met het tellen van de algen, en als nodig een nieuwe regressievergelijking op te stellen.

In belang van de reproduceerbaarheid van OD-metingen zijn er enkele richtlijnen die zeer strikt moeten nageleefd worden:

- De cuvetten moeten steeds in dezelfde richting in de houder van de spectrofotometer geplaatst worden, nl. met de pijlen op de zijwanden van de cuvet wijzend naar links.
- Men doet steeds een 0-calibratie met de spectrofotometer vooraleer te starten met de OD-metingen van algensuspensies. Deze 0-calibratie gebeurt steeds met dezelfde cuvet, gevuld met algengroeimedium. Men herhaalt deze 0-calibratie regelmatig (minstens om de 10 metingen) tijdens langere meetreeksen van algensuspensies.
- De algensuspensies in elk van de cuvetten, goed afgesloten met afdekplaatje worden elk apart gedurende 10 sec. grondig geschud met omkeren (zie foto's in handleiding van de testkit) voor een homogene verdeling van de algen, vlak voordat de cuvet in de spectrofotometer wordt geplaatst.
- De meting van OD gebeurt voor elke cuvet apart na ongeveer 10 sec. schudden (na het verdwijnen van eventuele luchtbelletjes en/of schuim).

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

5.5.2.3 BEREIDING VAN EEN GECONCENTREERDE ALGENINOCULUM

- Men zet de spectrofotometer op voor meting van algensuspensie bij 670 nm.
- Giet de 10 ml tube van de gede-immobiliseerde algenbeads in een maatkolf van 25 ml.
- Vul aan met algengroeimedium, sluit af en schud voor een homogene algensuspensie.
- Neem de 2 cuvetten, met respectievelijk het label 'Calibration long cell' en 'Algal stock cell'.
- Vul de cuvet 'calibration long cell' met 25 ml algengroeimedium en sluit af.
- Plaats de cuvet in de goede richting in de spectrofotometer en doe de 0-calibratie.
- Vul de cuvet 'algal stock cell' met de 25 ml uit de kolf met de algensuspensie, sluit goed af en schud gedurende 10 sec.
- Plaats de cuvet in de goede richting in de spectrofotometer en lees OD1 af na ongeveer 10sec.
- Neem de sheet met de grafiek OD/N en bereken het aantal algen (N1) overeenkomstig de gemeten OD1 van de stock.
- Het doel is om een geconcentreerd algeninoculum te maken met 1.10^6 algen/ml (= N2).
- Bereken de ratio N1/N2 hetgeen de verdunningsfactor is van de algensuspensie in de meetcuvet om een optische densiteit OD2 te bekomen die correspondeert met een algendensiteit van 1.10^6 algen/ml.
- Neem een maatkolf van 25 ml (indien verdunningsfactor < 2), of een maatkolf van 50 ml (als verdunningsfactor≥ 2). Neem een gehomogeniseerd substaal uit de meetcuvet 'Algal stock cell', overeenkomstig de gewenste verdunning in de maatkolf, en leng aan met groeimedium tot aan de maatstreep, sluit af en homogeniseer de algensuspensie.
- Neem een meetcuvet en vul met 25 ml van de nieuwe algenstock, sluit af en schud 10 sec. om vervolgens de OD te meten, nl. OD2. Controleer met de regressievergelijking of deze OD2 het verwachte aantal algen 1.10^6 algen/ml (N2) oplevert.

5.5.3 TESTOPLOSSINGEN VAN WATERMONSTERS

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. De test met milieumonsters wordt steeds uitgevoerd met correctie bij spectrofotometrische analyse van de testoplossingen, parallel aan controle met groeimedium.

Voor elk van de testoplossingen (en controle met algengroeimedium) wordt voldoende gemaakt voor de volgende testvolumes, en overeenkomstig worden maatkolven van voldoende volume gebruikt.

- Limiettest: 6 replica's x 25 ml
- Limiettest met correctie: 6 replica's x 25 ml + 1 replica 25 ml (zonder algen) voor correctie
- Verdunningsreeks: 3 replica's x 25 ml/testconditie, en volume watermonster nodig voor reeks van 5 diluties met een verdunningsfactor 2.
- Verdunningsreeks met correctie voor elke dilutie van het watermonster: 3 replica's x 25 ml + 1 replica 25 ml (zonder algen) voor correctie/ test conditie, en volume watermonster nodig voor reeks van 5 diluties met een verdunningsfactor 2.

5.5.3.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

Het water wordt standaard in een limiettest geëvalueerd als onverdund water (of hoogste mogelijke testconcentratie) in vergelijking met een controle conditie (100% algengroeimedium). Echter door het toevoegen van nutriënten stockoplossing bij het water (1.3 ml/100 ml), en een geconcentreerd algeninoculum (1ml/100 ml), overeenkomstig de nutriënten concentratie en algen in het algengroeimedium (= controle), zal de hoogst geteste concentratie water niet helemaal 100% zijn, maar 97.7%. Deze afwijking qua geteste concentratie is beperkt en wordt verwaarloosd, mits de

verhouding toegevoegde nutriënten volume en volume algeninoculum op het totaal volume watermonster steeds overeenkomt met deze in de controle conditie.

De bereiding van testoplossingen met water, en controle met algengroeimedium voor de limiettest met correctie (voor kleur en/of turbiditeit) wordt bij wijze van voorbeeld hierna uitgewerkt[4].

- Neem 2 maatkolven, elk van 250 ml, markeer C0 (controle) en CW (watermonster)
- Breng 250 ml algengroeimedium in kolf C0 (zie bereiding 5.5.1)
- Breng 200 ml water (100%) in kolf CW, voeg 2.5 ml van nutriëntenstock A, 0.25 ml van nutriëntenstock B, 0.25 ml van nutriëntenstock C en 0.25 ml van nutriëntenstock D, leng aan met watermonster tot aan de maatstreep voor 250ml, sluit af en homogeniseer.
- Neem 50 ml af uit de kolf C0, dit is algengroeimedium voor de 0-calibratie, en markeer als C0-calibratie.
- Neem 50 ml af uit de kolf CW, dit is testoplossing voor de kleur- en turbiditeit correctie, en markeer als CW-correctie.
- In de kolf C0 blijft 200 ml algengroeimedium; hier wordt 2 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding (zie 5.5.2.3), zodat de eindconcentratie algen in C0 overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie.
- In de kolf CW blijft 200 ml water met nutriënten; hier wordt 2 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding (zie 5.5.2.3), zodat de eindconcentratie algen in CW overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie. Deze verdunning resulteert in een hoogste testconcentratie van het watermonster van 97.7%.

5.5.3.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC_{50} BEPALING

Indien van toepassing (bijv. volgens bijzondere voorwaarde in vergunning van het bedrijf) moet het water in een verdunningsreeks getest worden om een EC_{50} waarde te bepalen. Hiervoor wordt het water verdund met algengroeimedium (zie 5.5.1), voor minstens 5 concentraties met een verdunningsfactor 2, van het water in vergelijking met controle (0% water in algengroeimedium). Men zal analoog te werk gaan als bij de limiettest door eerst het onverdunde water aan te vullen met nutriënten, overeenkomstig het groeimedium voor de controle. Pas daarna zal de 1:1 verdunning van het watermonster met groeimedium gebeuren, en wordt algeninoculum toegevoegd bij elke testconcentratie van het watermonster, zoals bij de controle.

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 ≤ 10%, en met indien mogelijk meerdere punten op de helling van de concentratie-effect curve om een nauwkeurige EC_{50} waarde te berekenen. Indien er weinig tot geen effect is (< 50% acute toxiciteit), kan er geen EC_{50} waarde bepaald worden.
Een voorbeeld van bereiding van testoplossingen voor een dilutiereeks is terug te vinden in de handleiding bij de AlgaltoxkitF.

[4] Rekenvoorbeeld voor 250 ml kolven zodat er ruimere marge is op volume testoplossing (inclusief correctie), maar overeenkomstig aan te passen voor 200 ml startvolume.

http://www.emis.vito.be --- Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025
emis

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025
http://www.emis.vito.be

5.5.4 BLOOTSTELLING

5.5.4.1 BLOOTSTELLINGSCONDITIES

- Duur: (72 ± 2) u
- Licht-donker cyclus: continue belichting, 3000-4000 lux aan onderzijde van cuvetten, 10000 lux in geval van zijdelingse belichting.
- Dagelijks moeten de algen in de cuvetten manueel geresuspendeerd worden door schudden met omkeren (zie instructies handleiding).
- Temperatuur van testoplossingen: (23 ± 2)°C tijdens blootstelling, een temperatuur-gecontroleerde ruimte te gebruiken voor de test. Via een temperatuurlogger in een testbeker (25 ml test vloeistof) naast de testrecipiënten wordt de temperatuur opgevolgd gedurende de blootstellingsperiode.
- Testrecipiënt: polystyreen cuvetten, met afdekplaatje zoals voorzien bij AlgaltoxkitF (alternatieven zijn toegestaan, zie 5.1).
- Testvolume: 25 ml per cuvet (long cell) in de AlgaltoxkitF.
- Replica's: 6 per testconditie in de limiettest, 3 per conditie in de test met verdunningsreeks. Het aantal replica's voor de controle algengroei en de testcondities van het monster zijn gelijk.

5.5.4.2 TRANSFER TESTOPLOSSINGEN NAAR DE TESTRECIPIËNTEN (LONG CELL CUVETTEN)

- Neem het nodige aantal cuvetten (inclusief afdekplaatje), 18 per verzamelbakje, de plastiek strip en rubbers om samen te houden. Markeer de cuvetten voor de verschillende testcondities, met nummering voor de replica cuvetten/conditie.
- Neem de bereide testoplossingen met algen C0, en CW, homogeniseer de oplossingen door schudden en vul de cuvetten telkens met 25 ml, met voor een limiettest 6 cuvetten per conditie (3 bij een dilutiereeks). Dus totaal 12 cuvetten voor een limiettest, en 18 cuvetten voor een dilutiereeks (3 x 5 concentraties watermonster + 3 x controle).
- Neem de 50 ml oplossingen (zonder algen) van controle (C0-calibratie), en van watermonster (voor CW-correctie). Indien men met een dilutiereeks werkt, zal er voor elke concentratie van watermonster een oplossing zijn voor correctie. Vul voor elk van de condities 1 cuvet met 25 ml algengroeimedium (C0-calibratie) of van de testoplossing (CW-correctie).
- Al de gevulde cuvetten worden afgedekt en at random verdeeld voor testcondities, en replica's over verschillende verzamelbakjes. Plaats de cuvetten volgens de pijl op de zijwand in dezelfde richting. Voor de incubatie worden de afdekplaatjes voor elk van de cuvetten deels opgelicht, en men schuift aan de halfopen zijde de plastic strip tussen de cuvetten en het afdekplaatje zodat er open ruimte is voor gasuitwisseling zodat pH variatie beperkt blijft.
- In lijn met ISO 8692, wordt er uitgegaan van een nominale algendensiteit bij start van de test (zoals kan bepaald worden op basis van OD2 meting en 1:100 verdunning), en die tussen 0.5-1.5.10^4 algen/ml moet liggen. Er wordt geen spectrofotometrische meting uitgevoerd op T=0.
- De verzamelbakjes worden nu voor (72 ± 2) u incubatie, bij de juiste temperatuur en lichtcondities in de incubator of gethermostatiseerde kamer gezet. De cuvetten worden dagelijks manueel geschud om de algensuspensie te homogeniseren.
- De resterende testoplossingen in de maatkolven C0 en CW, met algeninoculum worden gebruikt voor meting van pH bij start van de test in alle testoplossingen van de limiettest of test met verdunningsreeks.

5.5.5 EVALUATIE VAN TEST

- Zowel in de limiettest als bij een verdunningsreeks wordt de optische densiteit enkel na (72 ± 2) u afgelezen.
- Zet de spectrofotometer op en neem de verzamelbakjes met cuvetten uit de incubator.

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

- Zorg ervoor bij de meting dat de cuvetten steeds in de goede richting (pijl naar links) in de meetcel staan.
- Begin met een 0-calibratie met de cuvet met algengroeimedium (zonder algen).
- Schud elk van de controle cuvetten gedurende 10 sec. en meet binnen 10 sec. de OD voor elk van de replica's van de controlegroep en registreer op laboformulier.
- Neem de cuvet voor CW-correctie (hoogste concentratie watermonster zonder algen), en doe hiermee een 0-calibratie. Schud vervolgens de replica's van de corresponderende testoplossing watermonster met algen, en meet na ongeveer 10 sec. op de spectrofotometer. Indien een dilutiereeks getest wordt, doe per dilutie eerst een 0-calibratie met de testoplossing zonder algen, en vervolg met de replica cuvetten met algen voor de corresponderende concentratie van testoplossing. Registreer al de gemeten OD-waarden.
- De testvloeistof van de replica cuvetten met algen wordt gepoold voor meting van de pH. De meting wordt uitgevoerd voor de controle conditie en alle testcondities van het watermonster.
- De temperatuurregistraties tijdens de incubatieperiode worden afgelezen voor min. en max. temperatuur, die gerapporteerd wordt.

5.5.6 BEREKENING VAN RESULTAAT VOOR GROEI-INHIBITIE NA 72 U

5.5.6.1 BEREKENING BIOMASSA OPBRENGST EN GROEISNELHEID

Er worden 2 eindpunten berekend op basis van evaluaties: opbrengst (biomassa) en groeisnelheid, maar enkel de parameter groeisnelheid wordt voor beoordeling van watermonster gerapporteerd. De berekende toename van biomassa gedurende (72 ± 2) u wordt gehanteerd als geldigheidscriterium voor de test.
Microbiotests beschikt over een rekentemplate beschikbaar voor verwerking van data op basis van uitgevoerde OD-metingen, en de regressievergelijking voor relatie OD versus aantal algen voor de gebruikte algenbatch. De berekeningen zijn gebaseerd op volgende formules.

Groeisnelheid

De gemiddelde specifieke groeisnelheid voor een specifieke periode is de logaritmische toename in biomassa: voor elke replica van respectievelijk de controlegroep, en een concentratie van watermonster wordt deze specifieke groeisnelheid μ 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 per replica wordt gemeten voor de totale periode (0 (=i) – 3 (=j) dagen).

Bereken voor de replica's van de controlegroep, een gemiddelde groeisnelheid, μ_c.

Bepaal vervolgens voor elke replica van de testoplossingen met watermonsters de procentuele inhibitie van groeisnelheid als functie van de gemiddelde groeisnelheid van de controle, μ_c met volgende formule:

$$\%I_{ra} = (\mu_c - \mu_a) \times 100 / \mu_c$$

Waarin: μ_c = gemiddelde van specifieke groeisnelheid in controle
μ_a = specifieke groeisnelheid in replica van concentratie a
I_{ra} = % inhibitie van de groeisnelheid voor replica van concentratie a

http://www.emis.vito.be

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

Bereken voor de replica's van elke testconditie van het watermonster, een gemiddelde % groeisnelheid, $I_{ra.}$

Opbrengst biomassa

De opbrengst van biomassa, Y voor elke replica van de controlegroep en testoplossing wordt berekend als het verschil tussen biomassa op 72 u en op t=0 u. In laatste geval wordt de nominale concentraties voor biomassa gebruikt. De OD-waarden (biomassa equivalent) worden omgerekend in aantal algen.

$$Y_{i-j} = BE_i - BE_j$$

Waarin: BE = biomassa equivalent
i-j = tijdsperiode, met 0 (=i) – 3 (=j) dagen.

Een gemiddelde biomassa opbrengst wordt berekend voor de controlegroep Y_c, en de toename van biomassa in elke replica van de testoplossingen (Y_a) wordt uitgedrukt als % van het gemiddelde van de controlegroep via volgende formule:

$$\%I_{ba} = (Y_c - Y_a) \times 100 / Y_c$$

Waarin: Y_c = gemiddelde van biomassa toename in controle
Y_a = biomassa toename in replica a van testoplossing a
$\%I_{ba}$ = % inhibitie van de biomassa voor replica van concentratie a

Bereken voor de replica's van elke testconditie van het watermonster, een gemiddelde procentuele biomassa $I_{ba.}$ relatief t.o.v. controlegroep.

5.5.6.2 LIMIETTEST VOOR % INHIBITIE GROEISNELHEID

De aflezing van OD op (72 ± 2) u (voor elke van de replica's van de hoogste concentratie van watermonster), met omrekening naar aantal algen resulteert in een groeisnelheid over 3 dagen in vergelijking met de groeisnelheid voor de controle replica's. De inhibitie van groeisnelheid wordt uitgedrukt als gemiddelde van inhibitie van groeisnelheid voor de individuele replica's, relatief ten opzichte van de gemiddelde groeisnelheid van controlegroep.
Rapportage van het % effect in de limiettest is dus het gemiddelde van de % inhibitie van groeisnelheid in de hoogste concentratie van het watermonster.

5.5.6.3 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC_{50} BEPALING

- Per replica van elke concentratie watermonster en controle wordt de groeisnelheid over periode van (72 ± 2) u berekend.
- De gemiddelde groeisnelheid van de controlegroep wordt berekend op basis van groeisnelheid van alle controle replica's.
- Het % inhibitie van de groeisnelheid, als gemiddelde van de replica's per testconcentratie van het watermonster in de verdunningsreeks, wordt uitgedrukt als functie van de gemiddelde groeisnelheid in de controlegroep. Dit resulteert in een % effect voor elke dilutie van watermonster.
- De resultaten van % effect (Y-as) voor inhibitie algengroei worden grafisch voorgesteld als functie van de concentratie (% verdunning) van het water (X-as). Mits een goed concentratie-effect verband kan een E_rC_{50} waarde berekend worden voor de inhibitie van groeisnelheid.

http://www.emis.vito.be

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

- Een E_rC_{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 E_rC_{50} te situeren tussen deze beide concentraties.

5.5.7 KWALITEITSCONTROLE

5.5.7.1 EERSTELIJNSCONTROLE

Beslissingscriterium voor geldigheid van de test:

- De toename van biomassa in de controle gedurende (72 ± 2) u moet minstens een factor 16 zijn.
- De variatie van de groeisnelheid tussen de controle replica's over de periode van (72 ± 2) u mag niet groter zijn dan 7% (n=6, limiettest), en niet groter dan 10% (n=3, test verdunningsreeks).
- De pH in de controle conditie mag maximum 1.5 pH eenheid verschillen tussen begin en einde van de test.

Deze waarden worden bijgehouden in limietkaarten.

Herkomst en kwaliteit van testorganismen:

- Bij het gebruik van algenbeads uit de AlgaltoxkitF wordt steeds het batchnummer op het laboformulier vermeld. De gegevens over de gevoeligheid van elke gebruikte batch in de vorm van een E_rC_{50} en E_bC_{50} voor referentiestof, uitgevoerd door Microbiotests worden bijgehouden in een databestand.
- Bij gebruik van algen uit een continue labocultuur is een logboek ter beschikking om het onderhoud met de aankoop van algen met identificatie (bijv. bij UK, Culture Collection of Algae and Protozoa, https://www.ccap.ac.uk/), het gebruikte groeimedium, passages en condities van onderhoud op te volgen.

5.5.7.2 TWEEDELIJNSCONTROLE

De methode toegepast in het labo, hetzij vertrekkende van algenbeads, hetzij met algen uit continue cultuur, wordt op de hieronder vermelde tijdstippen uitgevoerd met een positieve controle (Kaliumbichromaat) waarvoor de ErC_{50} bepaald wordt na 72 u voor een dilutiereeks van 1.8 tot 0.18 mg/l (voor details zie handleiding AlgaltoxkitF).

- De ErC_{50} wordt geregistreerd in een statistische controlekaart, naast deze van de corresponderende batch voor de AlgaltoxkitF, indien van toepassing.
- 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.

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 ErC_{50} resultaten van de positieve controle niet voldoen aan de statistische grenzen voor algen gebruikt uit eigen kweek, of de door MicroBioTests aangegeven grenzen op de specificatie sheet van de beads, of als één of meer van de geldigheidscriteria voor de controle niet voldoen, 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 watermonsters. 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 monster, gegevens over monstername, 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), met motivatie voor keuze van testorganisme a.d.h.v. gemeten randvoorwaarde en type test (limiet, of verdunningsreeks).
- Resultaten:
  - Fysicochemische parameters van testoplossingen en controle op T=0 en T=72u
  - % effect voor inhibitie van groeisnelheid na (72 ± 2) u in controle en watermonster (limiettest) of
  - E_rC_{50}, met methode van berekening, voor inhibitie van groeisnelheid na (72 ± 2) u bij verdunningsreeks van watermonster, met % effect in de hoogst geteste concentratie van het watermonster en grafiek voor concentratie-effect op 72u.
- Opmerkingen en afwijkingen.

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025
http://www.emis.vito.be
emis

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025
http://www.emis.vito.be

6 GROEI-INHIBITIE TEST MET DE ZOUTWATERALG, PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM

6.1 INLEIDING

De uitvoering van de groei-inhibitietest voor de zoutwateralg is gebaseerd op de internationale richtlijnen, ISO 10253 (2016).

Voor de uitvoering van deze test zal men gebruik maken van een commerciële kit, de AlgtoxkitM (https://www.microbiotests.com/) met de zoutwateralg of kiezelwier soort, *Phaeodactylum tricornutum*. Stocks voor bereiding van synthetisch zoutwater, en stocks van nutriënten voor bereiding van zoutwateralgen medium (ook dilutie medium), test- en meetrecipiënt en algen zijn aanwezig in de kit, of kunnen afzonderlijk aangekocht worden. De algen worden aangeboden als een geconcentreerd inoculum, waarbij de algen geïmmobiliseerd zijn in een inerte matrix en tot 6 maanden in de koelkast (5 ± 3)°C bewaard kunnen blijven. Bij de testkit worden spectrofotometrische cuvetten met een weglengte van 10 cm aangeboden, met een afdekplaat, die tegelijk als testrecipiënt en meetcel fungeren.

De beschrijving in deze WAC-procedure is gebaseerd op uitvoering met de AlgtoxkitM.

Qua uitvoering zijn er evenwel een aantal varianten qua meetmethode, testrecipiënten, startcultuur van algen mogelijk, mits aan bepaalde voorwaarden is voldaan.

- Voor deze test is het ook toegestaan gebruik te maken van algen uit een continue cultuur in het labo, mits deze gezond is door wekelijkse passage op een rijk algenmedium. De algencultuur wordt onderhouden in steriele 250 ml glazen erlenmeyers met lucht-doorlaatbare stoppen in temperatuur- en licht gecontroleerde omstandigheden. Een precultuur wordt gemaakt 2-4 dagen voor start van de toxiciteitstest (specificaties: zie BIJLAGE A).
- De bereiding van zoutwateralgengroeimedium met nutriënten (en dilutie medium) is ook mogelijk vertrekkende van reagentia van analytische kwaliteit. Een werkwijze voor de bereiding en de samenstelling van het medium is te vinden in BIJLAGE C.
- De biomassa of concentratie van algen wordt klassiek bepaald met een deeltjes teller (voor sferische deeltjes in range 2.5 - 25 µm), of via microscopische evaluatie met telkamer. Alternatieve meetmethoden, zoals fluorescentie (excitatie 465 nm, emissie 670 nm) of spectrometrie (670 nm) zijn indirecte methoden die mits voldoende gevoelig en mits een correlatie tussen het signaal en algenconcentratie is aangetoond, ook gebruikt kunnen worden om groei te meten als biomassa equivalent. De AlgtoxkitM meet biomassa via spectrofotometrische analyse, die voldoende gevoelig is door het gebruik van meetcuvetten met een weglengte van 10 cm. Verder wordt er bij elke testkit en overeenkomstige batch van algen een werkblad geleverd met de correlatie tussen het OD-signaal voor spectrometrie met de 10 cm cuvetten en het aantal algen. De regressievergelijking wordt gebruikt bij de berekening van de resultaten om het gemeten OD-signaal uit te drukken als aantal algen/ml.
- De klassieke test beschreven onder ISO 10253 (2016), maakt gebruik van steriele, glazen erlenmeyers (bijv. 250 ml) met luchtdoorlaatbare stoppen als testrecipiënt. Gelijkaardig materiaal, als steriele wegwerp celcultuurflessen zijn een valabel alternatief alsook multiwell platen of de 10 cm cuvetten in de AlgtoxkitM. Het materiaal en de geometrie van de testrecipiënten moet zodanig zijn dat uitwisseling van gassen naar de lucht door groei van algen mogelijk is, terwijl verlies en evaporatie van potentieel toxische stoffen vermeden wordt (zie ook Annex B in ISO 10253). De gekozen testrecipiënten moeten zodanig zijn dat aan de geldigheidscriteria voor de test met algen voldaan wordt (zie 6.5.7.1).

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

6.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Thermometer en logger voor registratie min. en max. temperatuur
- pH-meter voor meting conform WAC/III/A/005
- Geleidbaarheidsmeter voor meting geleidbaarheid conform WAC/III/A/004
- Materiaal en apparatuur voor de bepaling van ammonium en hardheid.
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg.
- Algenincubator, of klimaatkamer met lichtbron, instelbare temperatuur (20 ± 2)°C en schudtoestel (tenzij de algen minstens dagelijks geresuspendeerd worden via manueel schudden zoals van toepassing bij de AlgaltoxkitF).
- Lichtbron, 3000-4000 Lux voor onderlangse verlichting, 10000 Lux voor zijdelingse verlichting.
- Lux meter
- Vortex
- Pipetten en toebehoren.
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven, maatcilinders voor bereiding van testoplossingen en verdunningen.
- Recipiënten voor meting van fysicochemische parameters.
- Tube met algeninoculum van zoutwateralg, *Phaeodactylum tricornutum* (zie AlgaltoxkitM), met een specificatie sheet met batch nummer van het inoculum, houdbaarheidsdatum, E_bC_{50} & E_rC_{50} waarden van Kaliumbichromaat voor de batch, en een sheet met regressievergelijking optische densiteit (OD) versus aantal algen (N) voor de batch.
- Polystyreen long cells of cuvetten (10 cm), met afdekplaatje, geplaatst in verzamelbak te gebruiken als testrecipiënten (zie AlgaltoxkitM), en 2 polystyreen long cells, met afdekplaatje voor 0-calibratie van spectrofotometer, en cuvet voor opzetten van precultuur.
- Spectrofotometer, met meetcel geschikt voor cuvetten van 10 cm weglengte[5].

6.3 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Gedemineraliseerd water (< 10 µS/cm).
- 7 flesjes met geconcentreerde zoutoplossingen voor het synthetisch zoutwater, en 3 flesjes met geconcentreerde stocks voor nutriënten (zie AlgaltoxkitM) of de nodige zouten van analytische kwaliteit, zoals in Tabel 6 en Tabel 7 (zie BIJLAGE C) voor de bereiding van zoutwateralgengroeimedium.
- 1N HCl en 1N NaOH voor pH aanpassing van groeimedium.
- 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 en op kamertemperatuur gebracht.

Naast de meting van geleidbaarheid voor keuze van soort alg worden andere fysicochemische parameters, zoals pH, hardheid en ammonium gemeten. Voor de meeste van deze parameters zijn

[5] Andere meetinstrumenten voor fluorescentie of deeltjesteller om aantal algen in testoplossing te kwantificeren zijn mogelijk.

er aanvaardbare ranges gedefinieerd waarbij er geen effect op groei zal optreden (Tabel 3, Postma et al., 2002).

Tabel 3: Randvoorwaarde voor fysicochemische parameters voor zoutwateralg.

Parameter	pH	Zuurstof (mg/l)	Geleidbaarheid (µS/cm)	Hardheid (mg/l $CaCO_3$)	Ammonium (mg/l NH_4^+, bij pH 8) [6]
Zoutwateralg, *Phaeodactylum tricornutum*	7 - 9	Niet relevant	> 22000 - ≤ 46000	g.d.	< 60

g.d.: geen data

Op basis van de meting van geleidbaarheid in het watermonster > 3300 µS/cm (zie 2, bij keuze van testorganisme) wordt met de zoutwateralg, *Phaeodactylum tricornutum* getest. Postma et al. (2002) stelt dat een geleidbaarheid < 11500 µS/cm in watermonsters kan bijdragen tot toxiciteit voor deze zoutwateralg. Naast eerdere preliminaire testen uitgevoerd bij Microbiotests werd via recent onderzoek aangetoond dat nadelige effecten op de groei van zoutwateralg in de range van >3300 tot en met 22000 µS/cm voorkomen, ondanks de toevoeging van micronutriënten. Er wordt daarom in het watermonster met een geleidbaarheid in de range van >3300 - 22000 µS/cm gecorrigeerd door 10 g/l NaCl toe te voegen om tegemoet te komen aan de zouttolerantierange voor de zoutwateralg. Er werd bovendien aangetoond dat toevoeging van NaCl aan een watermonster niet voldoende kan zijn voor optimale groei, maar ook de 6 andere zouten (flesjes 2-7, zie Tabel 4) zijn nodig. Details voor aanpassing van het watermonster met toevoeging van respectievelijk NaCl en /of 6 geconcentreerde zoutoplossingen in de testoplossing worden verder beschreven (zie 6.5.3), en dient gerapporteerd te worden.

Indien de geleidbaarheid in het watermonsters de bovengrens overschrijdt, dan zal in een limiettest het watermonster verdund worden tot 50% als hoogste concentratie (geen correctie met NaCl) om het % effect af te lezen. Bij het testen van een verdunningsreeks van het watermonster zullen er minstens 2 of 3 testcondities in het bereik van een geleidbaarheid ≤ 46000 µS/cm vallen (voldoet aan randvoorwaarde) om een EC_{50} af te leiden.

Indien de pH van het watermonster buiten de toegelaten range valt (< 7 of > 9), dan wordt meteen de pH aangepast met zuur of base tot een pH-waarde overeenkomstig die van het zoutwater controle medium ± 0.1.

De metingen van hardheid en ammonium worden gerapporteerd. In geval van afwijkende randvoorwaarden voor ammonium wordt er niet gecorrigeerd, maar wordt de overschrijding 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 uitgevoerd worden uitgevoerd door aanpassingen te doen (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] Randvoorwaarde ammonium bij pH> 8 kan lager zijn vanwege hogere toxiciteit, maar data ontbreken.

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025
http://www.emis.vito.be
emis

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

Naast de randvoorwaarden zijn er, specifiek voor de algentest, mogelijke interferenties op de meting van algen (meest uitgesproken bij de spectrofotometrische analyse) wanneer er veel zwevend stof is, en wanneer het water gekleurd of troebel is. De methode met de AlgaltoxkitM voorziet bij de spectrofotometrische meting een correctie voor kleur en turbiditeit (zie 6.5.4. Blootstelling), die men steeds moet toepassen bij een test op milieumatrices. De eventuele aanwezigheid van turbiditeit of kleur in het watermonster wordt gerapporteerd.

Indien er echter aanwijzingen zijn dat de methode met correctie geen betrouwbare resultaten geeft dan kan in overleg met de opdrachtgever de test opnieuw worden uitgevoerd nadat men het watermonster gaat behandelen, bijv. centrifugeren om overmaat zwevend stof te verwijderen of filtreren om steriel te maken en groei van micro-organismen die turbiditeit kunnen verhogen tijdens de incubatie uit te sluiten. Bij de rapportering moeten dergelijke behandelingen gemeld worden als een afwijking op de methode.

6.5 WERKWIJZE

6.5.1 ZOUTWATERALGENGROEIMEDIUM (CONTROLE) OF VERDUNNINGSWATER

Er zijn 7 flesjes in de AlgaltoxkitM met geconcentreerde zoutoplossingen voor de bereiding van synthetisch zeewater (Tabel 4).

Tabel 4: Flesjes met geconcentreerde zoutoplossingen geleverd bij de AlgaltoxkitM

Flesje nr.	Naam zoutoplossing	Concentratie flesje	Concentratie bereid zoutwater groeimedium
1	NaCl	2112 g/l	26.4 g/l
2	KCl	67.2 g/l	840 mg/
3	CaCl2.2H2O	133.6 g/l	1670 mg/l
4	MgCl2.6H2O	368 g/l	4600 mg/l
5	MgSO4.7H2O	446.4 g/l	5580 mg/l
6	NaHCO3	13.6 g/l	170 mg/l
7	H3BO3	2.4 g/l	30 mg/l

- Neem een maatkolf van 2 liter, en vul met ongeveer 1500 ml gedemineraliseerd water.
- Neem flesje 1 (NaCl) en breng in de kolf, en schud tot het zout is opgelost.
- Neem flesje 2 (KCl) en voeg toe in de kolf, en schudden tot opgelost is.
- Herhaal dit beurteling voor de andere flesjes, in volgorde van nummering, nl. flesje 3 ($CaCl_2.2H_2O$), flesje 4 ($MgCl_2.6H_2O$), flesje 5 ($MgSO_4.7H_2O$), flesje 6 ($NaHCO_3$) en flesje 7 (H_3BO_3).
- Sluit de kolf af en meng door schudden.

Er zijn 3 flesjes met stockoplossingen voor nutriënten in de AlgaltoxkitM, flesje A, B en C die corresponderen met de samenstelling van stockoplossingen 1, 2 en 3 van nutriënten in het ISO 10253 medium (zie Tabel 7 in BIJLAGE C).

- Neem flesjes A en voeg 30 ml (2x15 ml) toe in de kolf van 2 liter, sluit af en schud.
- Neem flesje B en voeg 1 ml toe in de kolf, sluit af en schud.
- Neem flesje C en voeg 2 ml toe in de kolf
- Leng aan tot 2 liter met gedemineraliseerd water, en schud tot een homogene oplossing.
- Label de kolf, en bewaar overnacht in het donker of doorborrel gedurende 30 min. voor evenwicht instelling.

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

- Voor gebruik als medium, en na evenwicht instelling wordt de pH gecontroleerd en bijgesteld indien nodig tot pH 8.0 ± 0.2, gebruik makend van 1N HCl of 1N NaOH.
- Het zoutwateralgengroeimedium kan donker en koel bij (5 ± 3)°C bewaard worden gedurende max. 1 maand.

Dit medium wordt zowel gebruikt om de precultuur van de algen op te starten (zie 6.5.2.1), alsook voor verdunningsmedium van watermonster in de test (zie 6.5.3) of als controle conditie in de test.

6.5.2 TESTORGANISMEN

Voor deze test maakt men gebruik van de diatomeeën of kiezelwier soort, *Phaeodactylum tricornutum.* Deze zoutwateralg kan in het labo aanwezig zijn als een continue cultuur, van waaruit voor de test een precultuur wordt gestart (zie BIJLAGE A).
Hierna beschrijven we het gebruik van algen uit de AlgtoxkitM om een inoculum te bereiden geschikt voor de opzet van een toxiciteitstest, zodat een continue cultuur niet vereist is.

6.5.2.1 PRECULTUUR VAN ZOUTWATERALGEN UIT DE ALGENINOCULUM

- Start een precultuur 3 dagen voor de geplande start van de test.
- Neem een tube met algeninoculum uit de kit, schud krachtig en giet voorzichtig de volledige inhoud in een cuvet (long cell, gemarkeerd preculturing cell).
- Spoel de tube 2x met telkens 7.5 ml zoutwateralgengroeimedium (zie bereiding 6.5.1), en breng dit over in de cuvet.
- Sluit de cuvet met het afdekplaatje, en incubeer bij (20 ± 2)°C in een temperatuur gecontroleerde kamer of incubator, met continu licht (koel, wit fluorescente lampen met 10000 Lux bij zijdelingse belichting of 3000-4000 Lux indien onderlangse belichting).
- Na 3 dagen wordt deze gebruikt voor bereiding van het geconcentreerde algeninoculum (zie 6.5.2.3).

6.5.2.2 METING VAN OPTISCHE DENSITEIT VAN ALGENSUSPENSIE VIA SPECTROMETRIE: AANDACHTSPUNTEN!

Metingen van optische densiteit (OD) zijn de maat voor hoeveelheid algen in suspensie na spectrofotometrische meting bij 670 nm, gebruik makend van de wegwerp cuvetten met weglengte 10 cm (long cells). Voor elke tube algen is er een specificatie sheet met batch nummer, en overeenkomstig een sheet met de regressievergelijking voor de relatie OD en aantal algen. Indien men een andere methode (of toestel) spectrofotometer gebruikt voor het kwantificeren van algen is het nodig om het gemeten signaal (bijv. de OD-meting, of fluorescentiemeting) te controleren met het tellen van de algen, en als nodig een nieuwe regressievergelijking op te stellen.

In belang van de reproduceerbaarheid van OD-metingen zijn er enkele richtlijnen die zeer strikt moeten nageleefd worden:

- De cuvetten moeten steeds in dezelfde richting in de houder van de spectrofotometer geplaatst worden, nl. met de pijlen op de zijwanden van de cuvet wijzend naar links.
- Men doet steeds een 0-calibratie met de spectrofotometer vooraleer te starten met de OD-metingen van algensuspensies. Deze 0-calibratie gebeurt steeds met dezelfde cuvet, gevuld met algengroeimedium. Men herhaalt deze 0-calibratie regelmatig (minstens om de 10 metingen) tijdens langere meetreeksen van algensuspensies.
- De algensuspensies in elk van de cuvetten, goed afgesloten met afdekplaatje worden elk apart gedurende 10 sec. grondig geschud met omkeren (zie foto's in handleiding van de testkit) voor een homogene verdeling van de algen, vlak voordat de cuvet in de spectrofotometer wordt geplaatst.
- De meting van OD gebeurt voor elke cuvet apart na 10 sec. (na het verdwijnen van eventuele luchtbelletjes en/of schuim) en vooraleer de algen terug uitzakken.

http://www.emis.vito.be

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

6.5.2.3 BEREIDING VAN EEN GECONCENTREERDE ALGENINOCULUM

- Men zet de spectrofotometer op voor meting van algensuspensie bij 670 nm.
- Neem de cuvet met de markering 'calibration long cell' uit de kit, en vul met 25 ml zoutwateralgengroeimedium, en sluit af.
- Plaats de cuvet in de goede richting in de spectrofotometer en doe de 0-calibratie.
- Neem de cuvet (preculturing cell) na 3 dagen incubatie, en schud krachtig om de algensuspensie homogeen te maken.
- Plaats de cuvet in de goede richting in de spectrofotometer en lees OD1 af na ongeveer 10sec.
- Neem de sheet (specifiek voor de algenbatch) voor de grafiek met regressievergelijking OD/N en bereken het aantal algen (N1) overeenkomstig de gemeten OD1 van de stock.
- Het doel is om een geconcentreerd algeninoculum te maken met 1.10^6 algen/ml (= N2).
- Bereken de ratio N1/N2 hetgeen de verdunningsfactor is van de algensuspensie in de meetcuvet om een optische densiteit OD2 te bekomen die correspondeert met een algendensiteit van 1.10^6 algen/ml.
- Neem een maatkolf van 25 ml (indien verdunningsfactor < 2), of een maatkolf van 50 ml (als verdunningsfactor≥ 2). Neem een gehomogeniseerd substaal uit de cuvet 'preculturing cell', overeenkomstig de gewenste verdunning in de maatkolf, en leng aan met groeimedium tot aan de maatstreep, sluit af en homogeniseer deze algenstock.
- Verwijder de inhoud van de cuvet 'preculturing cell', spoel met medium, en vul deze met 25 ml van de nieuwe algenstock, sluit af en schud 10 sec. om vervolgens de OD te meten, nl. OD2. Controleer met de regressievergelijking of deze OD2 het verwachte aantal algen 1.10^6 algen/ml (N2) oplevert.

6.5.3 TESTOPLOSSINGEN VAN WATERMONSTER

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

Voor elk van de testoplossingen (en controle met algengroeimedium) wordt voldoende gemaakt voor volgende testvolumes, en overeenkomstig maatkolven van voldoende volume gebruikt. Bij het testen van alle milieumatrices, vanwege mogelijke interferenties door kleur of turbiditeit zullen steeds cuvetten met testoplossing voor correctie worden ingezet.

- Limiettest : 3 replica's x 25 ml, voor elk van 3 testcondities ($CW_{100\%}$, $CW_{50\%}$, $CW_{90\%}$)
- Limiettest met correctie: 3 replica's x 25 ml + 1 replica 25 ml (zonder algen) voor correctie, voor elk van voornoemde 3 testcondities.
- Verdunningsreeks: 3 replica's x 25 ml/testconditie, en volume watermonster nodig voor reeks van 5 diluties met een verdunningsfactor 2.
- Verdunningsreeks met correctie voor elke dilutie watermonster: 3 replica's x 25 ml + 1 replica 25 ml (zonder algen) voor correctie/ test conditie, dus volume watermonster nodig voor reeks van 5 diluties (testconditie) met een verdunningsfactor 2.

6.5.3.1 LIMIETTEST VOOR % EFFECT

Het watermonster wordt standaard in een limiettest geëvalueerd waarbij voor de zoutwateralg 3 testcondities ($CW_{100\%}$, $CW_{50\%}$, $CW_{90\%}$) met elk 3 replica's in vergelijking met een controle conditie (100% algengroeimedium) opgezet worden. Door het toevoegen van nutriënten stockoplossing bij het watermonster (1.65 ml/100 ml), en een geconcentreerd algeninoculum (1ml/100 ml), overeenkomstig de nutriënten concentratie en algen in het algengroeimedium (= controle), zal de hoogst geteste concentratie water niet helemaal 100% zijn. Deze afwijking (97.35%) qua geteste concentratie watermonster is beperkt en wordt verwaarloosd, mits de verhouding toegevoegde

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

nutriënten volume en volume algeninoculum op het totaal volume watermonster overeenkomt met deze in de controle conditie. Deze testconditie wordt hierna gedefinieerd als $CW_{100\%}$.. Om enerzijds te voldoen aan de randvoorwaarden geleidbaarheid, en anderzijds de aanwezigheid van verschillende zouten nodig voor optimale groei te garanderen worden er 2 bijkomende testcondities voorzien. Het protocol voorziet toevoeging van NaCl (vast) indien het ruwe watermonster een geleidbaarheid heeft in de range >3300 - ≤22000 µS/cm. Toevoeging van NaCl is niet nodig wanneer de geleidbaarheid > 22000 µS/cm is. Voor beide scenarios van geleidbaarheid wordt een protocol beschreven.

De bereiding van 3 testoplossingen met watermonster (100% - 50 % en zoutcorrectie 90%), en controle met algengroeimedium voor de limiettest wordt bij wijze van voorbeeld hierna uitgewerkt. Er worden voor elke testconditie 3 replica's voorzien. In geval van correctie voor kleur en/of turbiditeit zullen de testvolumes en metingen overeenkomstig moeten aangepast worden.

Watermonster met geleidbaarheid >3300 - ≤22000 µS/cm

Testcondities:

- Neem 1 maatkolf, van 100 ml, markeer C0 (controle)
- Neem 1 maatkolf van 200 ml, markeer $CW_{100\%}$ (= watermonster 100%)
- Neem 1 maatkolf van 200 ml, markeer $CW_{50\%}$ (= watermonster 50%)
- Neem 1 maatkolf van 100 ml, markeer $CW_{90\%}$ (= watermonster 100% met zoutcorrectie door NaCl, en 6 zoutoplossingen om tegemoet te komen aan de groeicondities van de zoutwateralg).

Werkwijze:

- Breng 100 ml zoutwateralgengroeimedium in kolf C0
- Breng 150 ml watermonster in kolf $CW_{100\%}$
- Voeg nu de nodige nutriënten toe bij kolf $CW_{100\%}$: 3 ml van nutriëntenstock A, 0.100 ml van nutriëntenstock B en 0.200 ml van nutriëntenstock C, leng aan met watermonster tot aan de maatstreep voor 200 ml, sluit af en homogeniseer
- Breng 100 ml zoutwateralgengroeimedium in kolf $CW_{50\%}$
- Neem 100 ml af uit de kolf $CW_{100\%}$ en voeg deze toe aan kolf $CW_{50\%}$, sluit af en homogeniseer
- Verwijder vervolgens 100 ml testoplossing uit $CW_{50\%}$
- Breng 75 ml watermonster in kolf $CW_{90\%}$
- Weeg 1 g NaCl af. Voeg deze hoeveelheid toe aan de kolf $CW_{90\%}$, sluit af en meng door krachtig schudden totdat al het zout is opgelost.
- Voeg nu telkens 1.200 ml van de 6 geconcentreerde zoutoplossingen, flesjes 2 t.e.m. 7 toe aan kolf $CW_{90\%}$ (volgens Tabel 4: geconcentreerde zoutoplossingen in Algaltoxkit M)
- Voeg vervolgens de nodige nutriënten toe bij kolf $CW_{90\%}$: 1.5 ml van nutriëntenstock A, 0.050 ml van nutriëntenstock B en 0.100 ml van nutriëntenstock C, leng aan met watermonster tot aan de maatstreep voor 100 ml, sluit af en homogeniseer
- Neem 25 ml uit de kolf C0, dit is algengroeimedium voor de 0-calibratie, en markeer als C0 calibratie
- Neem 25 ml uit de kolf $CW_{100\%}$, dit is de testoplossing voor de 0-calibratie, en markeer als $CW_{100\%}$ calibratie
- Neem 25 ml uit de kolf $CW_{50\%}$, dit is de testoplossing voor de 0-calibratie, en markeer als $CW_{50\%}$ calibratie

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025
http://www.emis.vito.be

- Neem 25 ml uit de kolf $CW_{90\%}$, dit is de testoplossing voor de 0-calibratie, en markeer als $CW_{90\%}$ calibratie
- In de kolf C0 blijft 75 ml algengroeimedium, hier wordt 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding (zie 6.5.2.3), zodat de eindconcentratie algen in C0 overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie.
- In de kolf $CW_{100\%}$ blijft 75 ml watermonster met nutriënten, hier wordt ook 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding, zodat de eindconcentratie algen in $CW_{100\%}$ overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie. Dit resulteert in een hoogste testconcentratie van het watermonster van 97.35%.
- In de kolf $CW_{50\%}$ blijft 75 ml watermonster met nutriënten, hier wordt ook 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding, zodat de eindconcentratie algen in $CW_{50\%}$ overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie.
- In de kolf $CW_{90\%}$ blijft 75 ml watermonster met nutriënten, hier wordt ook 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding, zodat de eindconcentratie algen in $CW_{90\%}$ overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie. Dit resulteert in een hoogste testconcentratie van het watermonster van 90.15%.

Watermonster met geleidbaarheid >22000 µS/cm

Testcondities:

- Neem 1 maatkolf, van 100 ml, markeer C0 (controle)
- Neem 1 maatkolf van 200 ml, markeer $CW_{100\%}$ (= watermonster 100%)
- Neem 1 maatkolf van 200 ml, markeer $CW_{50\%}$ (= watermonster 50%)
- Neem 1 maatkolf van 100 ml, markeer $CW_{90\%}$ (= watermonster 100% met 6 zoutoplossingen om tegemoet te komen aan de groeicondities van de zoutwateralg)

Werkwijze:

- Breng 100 ml zoutwateralgengroeimedium in kolf C0
- Breng 150 ml watermonster in kolf $CW_{100\%}$
- Voeg nu de nodige nutriënten toe bij kolf $CW_{100\%}$: 3 ml van nutriëntenstock A, 0.100 ml van nutriëntenstock B en 0.200 ml van nutriëntenstock C, leng aan met watermonster tot aan de maatstreep voor 200 ml, sluit af en homogeniseer
- Breng 100 ml zoutwateralgengroeimedium in kolf $CW_{50\%}$
- Neem 100 ml af uit de kolf $CW_{100\%}$ en voeg deze toe aan kolf $CW_{50\%}$, sluit af en homogeniseer
- Verwijder vervolgens 100 ml testoplossing uit $CW_{50\%}$
- Breng 75 ml watermonster in kolf $CW_{90\%}$
- Voeg nu telkens 1.200 ml van de 6 geconcentreerde zoutoplossingen toe aan kolf $CW_{90\%}$ (volgens Tabel 4: geconcentreerde zoutoplossingen in Algaltoxkit M)
- Voeg vervolgens de nodige nutriënten toe bij kolf $CW_{90\%}$: 1.5 ml van nutriëntenstock A, 0.050 ml van nutriëntenstock B en 0.100 ml van nutriëntenstock C, leng aan met watermonster tot aan de maatstreep voor 100 ml, sluit af en homogeniseer
- Neem 25 ml uit de kolf C0, dit is algengroeimedium voor de 0-calibratie, en markeer als C0 calibratie

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

- Neem 25 ml uit de kolf $CW_{100\%}$, dit is de testoplossing voor de 0-calibratie, en markeer als $CW_{100\%}$ calibratie
- Neem 25 ml uit de kolf $CW_{50\%}$, dit is de testoplossing voor de 0-calibratie, en markeer als $CW_{50\%}$ calibratie
- Neem 25 ml uit de kolf $CW_{90\%}$, dit is de testoplossing voor de 0-calibratie, en markeer als $CW_{90\%}$ calibratie
- In de kolf C0 blijft 75 ml algengroeimedium, hier wordt 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding (zie 6.5.2.3), zodat de eindconcentratie algen in C0 overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie.
- In de kolf $CW_{100\%}$ blijft 75 ml watermonster met nutriënten, hier wordt ook 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding, zodat de eindconcentratie algen in $CW_{100\%}$ overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie. Dit resulteert in een hoogste testconcentratie van het watermonster van 97.35%.
- In de kolf $CW_{50\%}$ blijft 75 ml watermonster met nutriënten, hier wordt ook 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding, zodat de eindconcentratie algen in $CW_{50\%}$ overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie.
- In de kolf $CW_{90\%}$ blijft 75 ml watermonster met nutriënten, hier wordt ook 0.75 ml algeninoculum toegevoegd uit de gehomogeniseerde algenstock bereiding, zodat de eindconcentratie algen in $CW_{90\%}$ overeenkomt met 1.10^4 algen/ml, sluit de kolf af en schud voor een homogene algensuspensie. Dit resulteert in een hoogste testconcentratie van het watermonster van 90.15%.

6.5.3.2 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC_{50} BEPALING

Indien van toepassing (bijv. volgens bijzondere voorwaarde in vergunning van het bedrijf) moet het watermonster in een verdunningsreeks getest worden om een EC_{50} waarde te bepalen. Hiervoor wordt het watermonster verdund met zoutwateralgengroeimedium voor 5 concentraties met een verdunningsfactor 2, van het watermonster in vergelijking met controle (0% watermonster in algengroeimedium). Men zal analoog te werk gaan als bij de limiettest door eerst het onverdunde watermonster aan te vullen met nutriënten, en vast NaCl (10 g/l) indien correctie voor geleidbaarheid nodig is (range > 3300 - ≤ 22000 µS/cm). Men meet en rapporteert de geleidbaarheid van deze testoplossing in de hoogste concentratie. Pas daarna zal de 1:1 verdunning van het watermonster met zoutwateralgengroeimedium gebeuren, en wordt tot slot bij elke verdunning van het watermonster het algeninoculum (1 ml/100 ml) toegevoegd.
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 watermonster waarbij minstens 1 punt met 100% effect en een punt met een effect ≤ 10%, en met indien mogelijk meerdere punten op de helling van de concentratie-effect curve om een nauwkeurige EC_{50} waarde te berekenen. Indien er weinig tot geen effect is (< 50% acute toxiciteit), kan er geen EC_{50} waarde bepaald worden.
Een voorbeeld van bereiding van testoplossingen voor een dilutiereeks is terug te vinden in de handleiding bij de AlgaltoxkitM.

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025
http://www.emis.vito.be

6.5.4 BLOOTSTELLING

6.5.4.1 BLOOTSTELLINGSCONDITIES

- Duur: (72 ± 2) u
- Licht-donker cyclus: continue belichting, 3000-4000 lux aan onderzijde van cuvetten, 10000 lux in geval van zijdelingse belichting.
- Dagelijks moeten de algen in de cuvetten manueel geresuspendeerd worden door schudden met omkeren (zie instructies handleiding).
- Temperatuur van testoplossingen: (20 ± 2)°C tijdens blootstelling, een temperatuur-gecontroleerde ruimte te gebruiken voor de test. Via een temperatuurlogger in een testbeker (25 ml test vloeistof) naast de testrecipiënten wordt de temperatuur opgevolgd gedurende de blootstellingsperiode.
- Testrecipiënt: polystyreen cuvetten, met afdekplaatje zoals voorzien bij AlgaltoxkitM (alternatieven zijn toegestaan, zie 6.1).
- Testvolume: 25 ml per cuvet (long cell) in de AlgaltoxkitM.
- Replica's: 3 voor elk van de 3 testcondities in de limiettest, 3 per conditie in de test met verdunningsreeks. Het aantal replica's voor de controle algengroei en de testcondities van het monster zijn gelijk per type test.

6.5.4.2 TRANSFER TESTOPLOSSINGEN NAAR DE TESTRECIPIËNTEN (LONG CELL CUVETTEN)

- Neem het nodige aantal cuvetten (inclusief afdekplaatje), 18 per verzamelbakje, de plastiek strip en rubbers om samen te houden. Markeer de cuvetten voor de verschillende testcondities, met nummering voor de replica cuvetten/conditie.
- Neem de bereide testoplossingen met algen C0, en CW, homogeniseer de oplossingen door schudden en vul de cuvetten telkens met 25 ml, met voor een limiettest 3 cuvetten per conditie x 3 condities ($CW_{100\%}$, $CW_{50\%}$ en $CW_{90\%}$) en controle (C0). Dus totaal 12 cuvetten voor een limiettest, en 18 cuvetten voor een dilutiereeks (3x 5 concentraties watermonster + 3 x controle).
- Neem de oplossingen (zonder algen) van controle (C0-calibratie), en van watermonster (voor CW-correctie). Voor elke testconditie in de limiettest, $CW_{100\%}$, $CW_{50\%}$ en $CW_{90\%}$ is er een overeenkomstige testoplossing zonder algen voor correctie. Indien men met een dilutiereeks werkt, zal er voor elke concentratie van watermonster een oplossing zijn voor correctie. Vul voor elk van de condities 1 cuvet met 25 ml zoutwateralgengroeimedium (C0-calibratie) of van de testoplossing (CW-correctie).
- Al de gevulde cuvetten worden afgedekt en at random verdeeld voor testcondities, en replica's over verschillende verzamelbakjes. Plaats de cuvetten volgens de pijl op de zijwand in dezelfde richting. Voor de incubatie worden de afdekplaatjes voor elk van de cuvetten deels opgelicht, en men schuift aan de halfopen zijde de plastic strip tussen de cuvetten en het afdekplaatje zodat er open ruimte is voor gasuitwisseling zodat pH variatie beperkt blijft.
- In lijn met ISO 10253, wordt er uitgegaan van een nominale algendensiteit bij start van de test (zoals kan bepaald worden op basis van OD2 meting en 1:100 verdunning), en die tussen 0.5-1.5.10^4 algen/ml moet liggen. Er zal geen spectrofotometrische meting worden uitgevoerd op T=0.
- De verzamelbakjes worden nu voor 72 u incubatie, bij juiste temperatuur en lichtcondities in de incubator of gethermostatiseerde kamer gezet. De cuvetten worden dagelijks manueel geschud om de algensuspensie te homogeniseren.
- De resterende testoplossingen in de maatkolven C0 en CW, met algeninoculum worden gebruikt voor meting van pH en geleidbaarheid bij start van de test in alle testoplossingen, zowel voor limiettest als bij een verdunningsreeks. Indien er geen overmaat van de testoplossingen voorzien werd, dan kan men mits de nodige voorzorgen qua cross-

contaminatie, voor metingen bij begin van de test de testoplossingen gebruiken die voorzien worden om de calibratie of staalcorrectie te doen voor elk van de testcondities.

6.5.5 EVALUATIE VAN TEST

- Zowel in de limiettest als bij een verdunningsreeks wordt de optische densiteit enkel na (72 ± 2) u afgelezen.
- Zet de spectrofotometer op en neem de verzamelbakjes met cuvetten uit de incubator.
- Zorg ervoor bij de meting dat de cuvetten steeds in de goede richting (pijl naar links) in de meetcel staan.
- Begin met een 0-calibratie met de cuvet met zoutwateralgengroeimedium (zonder algen).
- Schud elk van de controle cuvetten gedurende 10 sec. en meet na ongeveer 10 sec. de OD voor elk van de replica's van de controlegroep en registreer op laboformulier.
- Neem de cuvet voor CW-correctie (hoogste concentratie watermonster zonder algen), en doe hiermee een 0-calibratie. Schud vervolgens de replica's van de corresponderende testoplossing watermonster met algen, en meet na ongeveer 10 sec. op de spectrofotometer. Indien een dilutiereeks getest wordt, doe per dilutie eerst een 0-calibratie met de testoplossing zonder algen, en vervolg met de replica cuvetten met algen voor de corresponderende concentratie van testoplossing. Registreer al de gemeten OD-waarden.
- De testvloeistof van de replica cuvetten met algen wordt gepoold voor meting van de pH. De pH meting wordt uitgevoerd voor de controle conditie en elke testconditie van het watermonster.
- De temperatuurregistraties tijdens de incubatieperiode worden afgelezen voor min. en max. temperatuur die gerapporteerd wordt.

6.5.6 BEREKENING VAN RESULTAAT VOOR GROEI-INHIBITIE NA 72 U

6.5.6.1 BEREKENING BIOMASSA OPBRENGST EN GROEISNELHEID

Er worden 2 eindpunten berekend op basis van evaluaties: opbrengst (biomassa) en groeisnelheid, maar enkel de parameter groeisnelheid wordt voor beoordeling van water gerapporteerd. De berekende toename van biomassa gedurende (72 ± 2) u wordt gehanteerd als geldigheidscriterium voor de test.
Microbiotests beschikt over een rekentemplate beschikbaar voor verwerking van data op basis van uitgevoerde OD-metingen, en de regressievergelijking voor relatie OD versus aantal algen voor de gebruikte algenbatch. De berekeningen zijn gebaseerd op volgende formules.

Groeisnelheid

De gemiddelde specifieke groeisnelheid voor een specifieke periode is de logaritmische toename in biomassa: voor elke replica van respectievelijk de controlegroep, en een concentratie van watermonster wordt deze specifieke groeisnelheid μ 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 per replica wordt gemeten voor de totale periode (0 (=i) – 3 (=j) dagen).

Bereken voor de replica's van de controlegroep, een gemiddelde groeisnelheid, μ_c.

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025
http://www.emis.vito.be
emis

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

Bepaal vervolgens voor elke replica van de testoplossingen met watermonsters de procentuele inhibitie van groeisnelheid als functie van de gemiddelde groeisnelheid van de controle, μ_c met volgende formule:

$$\%I_{ra} = (\mu_c - \mu_a) \times 100 / \mu_c$$

waarin : μ_c = gemiddelde van specifieke groeisnelheid in controle
μ_a = specifieke groeisnelheid in replica van concentratie a
I_{ra} = % inhibitie van de groeisnelheid voor replica van concentratie a

Bereken voor de replica's van elke testconditie van het watermonster, een gemiddelde groeisnelheid, I_{ra} relatief t.o.v. de controle conditie.

Opbrengst biomassa

De opbrengst van biomassa, Y voor elke replica van de controlegroep en testoplossing wordt berekend als het verschil tussen biomassa op 72 u en op t=0 u. In laatste geval wordt de nominale concentraties voor biomassa gebruikt. De OD-waarden (biomassa equivalent) worden omgerekend in aantal algen.

$$Y_{i-j} = BE_i - BE_j$$

Waarin: BE = biomassa equivalent
i-j = tijdsperiode, met 0 (=i) – 3 (=j) dagen.

Een gemiddelde biomassa opbrengst wordt berekend voor de controlegroep Y_c, en de toename van biomassa in elke replica van de testoplossingen (Y_a) wordt uitgedrukt als % van het gemiddelde van de controlegroep via volgende formule:

$$\%I_{ba} = (Y_c - Y_a) \times 100 / Y_c$$

Waarin: Y_c = gemiddelde van biomassa toename in controle
Y_a = biomassa toename in replica van testoplossing a
$\%I_{ba}$ = % inhibitie van de biomassa voor replica van concentratie a

Bereken voor de replica's van elke testconditie van het watermonster, een gemiddelde procentuele biomassa I_{ba} relatief t.o.v. controle groep.

6.5.6.2 LIMIETTEST VOOR % INHIBITIE GROEISNELHEID

De aflezing van OD op (72 ± 2) u voor elke replica van de ~~hoogste~~ 3 testcondities ~~centratie~~ van watermonster, met omrekening naar aantal algen per replica, resulteert in een groeisnelheid in vergelijking met de groeisnelheid voor de controle replica's. De inhibitie van groeisnelheid wordt uitgedrukt als gemiddelde van inhibitie van groeisnelheid van de individuele replica's, relatief ten opzichte van de gemiddelde groeisnelheid van controlegroep.
Rapportage van het % effect voor elk van de 3 testcondities in de limiettest als gemiddelde van de % inhibitie van groeisnelheid van de replica's.

6.5.6.3 TEST MET EEN VERDUNNINGSREEKS VOOR EC_{50} BEPALING

- Per replica van elke concentratie watermonster en controle wordt de groeisnelheid over de periode van (72 ± 2) u berekend.

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

- De gemiddelde groeisnelheid van de controlegroep wordt berekend op basis van groeisnelheid van alle controle replica's.
- Het % inhibitie van de groeisnelheid, als gemiddelde van de replica's per testconcentratie van het watermonster in de verdunningsreeks, wordt uitgedrukt als functie van de gemiddelde groeisnelheid in de controlegroep. Dit resulteert in een % effect voor elke dilutie van watermonster.
- De resultaten van % effect (Y-as) voor inhibitie algengroei worden grafisch voorgesteld als functie van de concentratie (% verdunning) van het water (X-as). Mits een goed concentratie-effect verband kan een E_rC_{50} waarde berekend worden voor de inhibitie van groeisnelheid.
- Een E_rC_{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 E_rC_{50} te situeren tussen deze beide concentraties.

6.5.7 KWALITEITSCONTROLE

6.5.7.1 EERSTELIJNSCONTROLE

Beslissingscriterium voor geldigheid van de test:

- De toename van biomassa in de controle gedurende (72 ± 2) u moet minstens een factor 16 zijn.
- De variatie van de groeisnelheid tussen de controle replica's over de periode van 72 u mag niet groter zijn dan 7% (n=3, limiettest), en niet groter dan 10% (n=3, test verdunningsreeks).
- De pH in de controle conditie mag maximum 1.5 pH eenheid verschillen tussen begin en einde van de test.

Deze waarden worden bijgehouden in limietkaarten.

Herkomst en kwaliteit van testorganismen:

- Bij het gebruik van algen uit de AlgaltoxkitM wordt steeds het batchnummer op het laboformulier vermeld. De gegevens over de gevoeligheid van elke gebruikte batch in de vorm van een E_rC_{50} en E_bC_{50} voor referentiestof, uitgevoerd door MicroBioTests worden bijgehouden in een databestand.
- Bij gebruik van algen uit een continue labocultuur is een logboek ter beschikking om het onderhoud met de aankoop van algen met identificatie (bijv. bij UK, Culture Collection of Algae and Protozoa, https://www.ccap.ac.uk/), het gebruikte groeimedium, passages en condities van onderhoud op te volgen.

6.5.7.2 TWEEDELIJNSCONTROLE

De methode toegepast in het labo, hetzij vertrekkende van algen uit de kits, hetzij met algen uit continue cultuur, wordt op de hierna vermelde tijdstippen uitgevoerd met een positieve controle (Kaliumbichromaat) waarvoor de E_rC_{50} bepaald wordt na 72 u voor een dilutiereeks van 32 tot 3.2 mg/l (voor details zie handleiding AlgaltoxkitM).

- De E_rC_{50} wordt geregistreerd in een statistische controlekaart, naast deze van de corresponderende batch voor de AlgaltoxkitM, 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.

http://www.emis.vito.be

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

6.5.7.3 DERDELIJNSCONTROLE

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

6.5.7.4 OPVOLGING VAN AFWIJKINGEN

Indien de E_rC_{50} resultaten van de positieve controles niet voldoen aan de statistische grenzen voor algen uit eigen kweek, of de door MicroBioTests aangegeven range op de specificatie sheet van de batch algen, of als één of meer van de geldigheidscriteria voor de controle niet voldoen, 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 watermonsters. 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 monster, gegevens over monstername, datum van testuitvoering met monster, resultaten van meting van 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 (geleidbaarheid) en type test (limiet, of verdunningsreeks).
- Resultaten:
  - Fysicochemische parameters van testoplossingen en controle op T=0 en T=72u
  - % effect voor inhibitie van groeisnelheid na (72 ± 2) u in controle en watermonster bij 3 testcondities $CW_{100\%}$, $CW_{50\%}$ en $CW_{90\%}$ (limiettest) of
  - E_rC_{50}, met methode van berekening, voor inhibitie van groeisnelheid na (72 ± 2) u bij verdunningsreeks van watermonster, met % effect in de hoogst geteste concentratie van het watermonster en grafiek voor concentratie-effect op 72u.
- Opmerkingen en afwijkingen.

7 REFERENTIES

- Handleiding AlgaltoxkitF: Freshwater toxicity test with Microalgae, Standard operating procedure.
- Handleiding AlgaltoxkitM: Marine toxicity test with Microalgae, Standard operating procedure.
- 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 sp. and Phaeodactylum tricornutum.
- OECD201 (2011). OECD guideline for testing of chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
- 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.

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

BIJLAGE A: LABOCULTUUR VAN ALGEN, EN BEREIDEN VAN PRECULTUUR

A.1 Kweek van algen

Alle handelingen worden met steriel materiaal uitgevoerd om besmetting met bacteriën of andere algen te voorkomen. Het is van wezenlijk belang dat de culturen slechts één algensoort bevatten.

De kweek bestaat uit kleine algenculturen die regelmatig (meestal eens per 2 weken, afhankelijk van de groei) in een vers medium worden overgebracht (passage) en die dienen als entmateriaal voor algentesten. Het medium voor de kweek is hetgeen welk aanbevolen wordt voor een specifiek algensoort door de leverancier van algen, de UK Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP (https://www.ccap.ac.uk/.). Bij ontvangst van algen en routinepassages worden de voorraadculturen gekweekt in erlenmeyers met medium.

Bij de passage wordt 4 ml oude cultuur overgebracht in een erlenmeyer met 100 ml vers medium zodat de beginconcentratie ongeveer 50 keer kleiner is dan in de oude cultuur. Het oude recipiënt waaruit het inoculum genomen werd, wordt daarna afgevoerd. Op alle kweekrecipiënten wordt de code van de algensoort aangebracht, en het passagenummer (dat dus eigenlijk een maat is voor de ouderdom van de batch). De kweek wordt opgevolgd in een logboek. In dit logboek wordt de datum genoteerd waarop de algen toekomen in het labo en alle passages. De grootte van de kweek kan worden aangepast aan de behoeften.

De culturen worden continu belicht bij kamertemperatuur. De erlenmeyers staan op een schudtafel en worden regelmatig geschud. Zij worden regelmatig op hun kleur beoordeeld: bij twijfel of afwijking wordt een staaltje onder de microscoop bekeken. Indien blijkt dat er problemen zijn met de cultuur wordt eventueel een nieuwe batch besteld bij CCAP. Via extra verversingen kan een aangetaste batch soms toch gered worden en terug normaal groeien. Deze batches mogen dan verder gebruikt worden voor testen. Algenculturen die misvormde of afwijkende cellen bevatten of die bacterieel/mycotisch besmet zijn, mogen niet verder gebruikt worden en moeten onmiddellijk verwijderd worden.

A.2 Opzetten van precultuur

De bedoeling van de voorcultuur is voldoende algen te krijgen voor het enten van de testrecipiënten. De algen zouden in hun exponentiële groeifase moeten zijn bij het begin van de test, zodat een optimale groeicurve bekomen wordt in de controles tijdens de 72 u blootstelling in de test. De precultuur wordt geïncubeerd met het algengroeimedium dat gebruikt zal worden voor de test. Doorgaans wordt een incubatieperiode van ongeveer drie tot maximaal 4 dagen in acht genomen: d.w.z. op vrijdag passeren om maandag of dinsdag een test te kunnen opstarten.

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

http://www.emis.vito.be

BIJLAGE B: ALGENGROEIMEDIUM (CONTROLE) EN VERDUNNINGSWATER VOOR DE ZOETWATERALGEN TEST

B.1 Bereiding van stockoplossingen van nutriënten

Voor de bereiding van stockoplossingen met zouten worden reagentia met gekende analytische zuiverheid gebruikt zoals deze in Tabel 5 (uit ISO 8692, 2012).
De stockoplossingen 1, 2, 3 en 4 worden gelabeld en gedateerd. Deze oplossingen worden gesteriliseerd, hetzij door membraanfiltratie bij 0.22 µm ofwel door autoclaveren bij (120 ± 2)°C gedurende 15 minuten. Enkel stockoplossing 4 mag niet in de autoclaaf, en zal gefiltreerd worden voor sterilisatie. De gesteriliseerde stockoplossingen kunnen gedurende 3 maanden donker en koel bewaard worden bij (5 ± 3)°C.

Tabel 5: Samenstelling van nutriënten in stock- en testoplossingen voor test met zoetwateralgen

Stock solution	Nutrient	Mass concentration in stock solution	Final mass concentration in test solution
1: Macronutrients	NH_4Cl	1,5 g/l	15 mg/l (N: 3,9 mg/l)
	$MgCl_2{\cdot}6H_2O$	1,2 g/l	12 mg/l (Mg: 2,9 mg/l)
	$CaCl_2{\cdot}2H_2O$	1,8 g/l	18 mg/l (Ca: 4,9 mg/l
	$MgSO_4{\cdot}7H_2O$	1,5 g/l	15 mg/l (S: 1,95 mg/l)
	KH_2PO_4	0,16 g/l	1,6 mg/l (P: 0,36 mg/l)
2: Fe-EDTA	$FeCl_3{\cdot}6H_2O$	64 mg/l	64 µg/l (Fe: 13 µg/l)
	$Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$	100 mg/l	100 µg/l
3: Trace elements	H_3BO_3[a]	185 mg/l	185 µg/l (B: 32 µg/l)
	$MnCl_2{\cdot}4H_2O$	415 mg/l	415 µg/l (Mn: 115 µg/l)
	$ZnCl_2$	3 mg/l	3 µg/l (Zn: 1,4 µg/l)
	$CoCl_2{\cdot}6H_2O$	1,5 mg/l	1,5 µg/l (Co: 0,37 µg/l)
	$CuCl_2{\cdot}2H_2O$	0,01 mg/l	0,01 µg/l (Cu: 3,7 ng/l)
	$Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$	7 mg/l	7 µg/l (Mo: 2,8 µg/l)
4: $NaHCO_3$	$NaHCO_3$	50 g/l	50 mg/l (C: 7,14 mg/l)

[a] H_3BO_3 can be dissolved by the addition of 0,1 mol/l NaOH.

B.2 Bereiding van zoetwateralgengroeimedium, of verdunningsmedium

Voor de bereiding van 1 liter groeimedium:

- Vul een maatkolf met 800 ml gedemineraliseerd water
- Voeg 10 ml toe van stockoplossing 1, sluit af, en homogeniseer
- Voeg 1 ml van stockoplossing 2, 1 ml van stockoplossing 3 en 1 ml van stockoplossing 4 toe, sluit af en homogeniseer
- Leng aan tot 1 liter met gedemineraliseerd water.

Laat het medium in evenwicht komen met de lucht door het overnacht te laten staan, of belucht gedurende 30 min. en meet daarna de pH, en stel die bij tot 8.1 ~~7.5~~ ± 0.2, met 1N HCl or 1N NaOH. Het medium is nu klaar voor gebruik.

Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025

BIJLAGE C: ALGENGROEIMEDIUM (CONTROLE) EN VERDUNNINGSWATER VOOR DE ZOUTWATERALGEN TEST

C.1 Bereiding synthetisch zoutwater

Voor de bereiding van synthetisch zeewater worden zoutenoplossingen gemaakt met reagentia van gekende analytische zuiverheid gebruikt. Synthetisch zeewater wordt gemaakt met de verschillende zouten en respectievelijke hoeveelheden zoals opgelijst in Tabel 6.
De oplossing wordt gelabeld en gedateerd, en wordt gefiltreerd (0.45 µm) voor gebruik. Deze bereiding van synthetisch zeewater wordt donker en koel (5 ± 3)°C bewaard worden gedurende 6 maanden.

Tabel 6: Samenstelling van zouten met hun concentraties in synthetisch zeewater (volgens ISO 10253, 2016).

Salt	Concentration of salt in synthetic sea water g/l
NaCl	22
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	9,7
Na_2SO_4 (anhydrous)	3,7
$CaCl_2$ (anhydrous)	1,0
KCl	0,65
$NaHCO_3$	0,20
H_3BO_3	0,023

C.2 Bereiding stockoplossing van nutriënten en verdunningen voor bereiding van zoutwateralgenmedium

De zouten die gebruikt worden voor de bereiding van nutriënten stockoplossingen 1, 2 en 3 (zie Tabel 7) zijn van gekende analytische zuiverheid.
Er worden 3 stockoplossingen bereid met hoeveelheden zoals in tabel. De 3 nutriëntenstockoplossingen worden gesteriliseerd via filtratie (0.2 µm). Alternatief kunnen stockoplossingen 1 en 3 ook door autoclaveren bij 120°C gedurende 15 min. gesteriliseerd worden. De stocks kunnen maximum 2 maanden bewaard worden in het donker bij 4°C.

C.3 Bereiding van zoutwateralgenmedium, of verdunningswater

Gebruik het synthetisch zeewater, om de stocks van nutriënten te verdunnen.
Voor de bereiding van 1 liter zoutwateralgengroeimedium:

- Vul een maatkolf met 900 ml synthetisch zeewater (zie C.1).
- Voeg 15 ml toe van nutriëntenstockoplossing 1, sluit af, en homogeniseer
- Voeg 0.5 ml van stockoplossing 2 en 1 ml van stockoplossing 3 toe in de kolf, sluit af en homogeniseer
- Leng aan tot 1 liter met synthetisch zeewater.

Controleer de pH en stel bij tot pH 8.0 ± 0.2 met HCl of NaOH.
Label de oplossing van zoutwateralgengroeimedium, die 1 maand in het donker en koel bij (5 ± 3)°C kan bewaard worden.

http://www.emis.vito.be

Tabel 7: Samenstelling van nutriënten in stock- en testoplossingen voor bereiding van zoutwateralgengroeimedium (volgens ISO 10253, 2016).

Nutrient	Concentration in stock solution	Final concentration in test solution
Stock solution 1		
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	48 mg/l	149 µg/l (Fe)
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	144 mg/l	605 µg/l (Mn)
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	45 mg/l	150 µg/l (Zn)
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,157 mg/l	0,6 µg/l (Cu)
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,404 mg/l	1,5 µg/l (Co)
H_3BO_3	1 140 mg/l	3,0 mg/l (B)
Na_2EDTA	1 000 mg/l	15,0 mg/l
Stock solution 2		
Thiamin hydrochloride	50 mg/l	25 µg/l
Biotin	0,01 mg/l	0,005 µg/l
Vitamin B_{12} (cyanocobalamin)	0,10 mg/l	0,05 µg/l
Stock solution 3		
K_3PO_4	3,0 g/l	3,0 mg/l; 0,438 mg/l P
$NaNO_3$	50,0 g/l	50,0 mg/l; 8,24 mg/l N
$Na_2SiO_3 \cdot 5H_2O$	14,9 g/l	14,9 mg/l; 1,97 mg/l Si

http://www.emis.vito.be --- Ministerieel besluit van 29 april 2025 --- Belgisch Staatsblad van 07 mei 2025