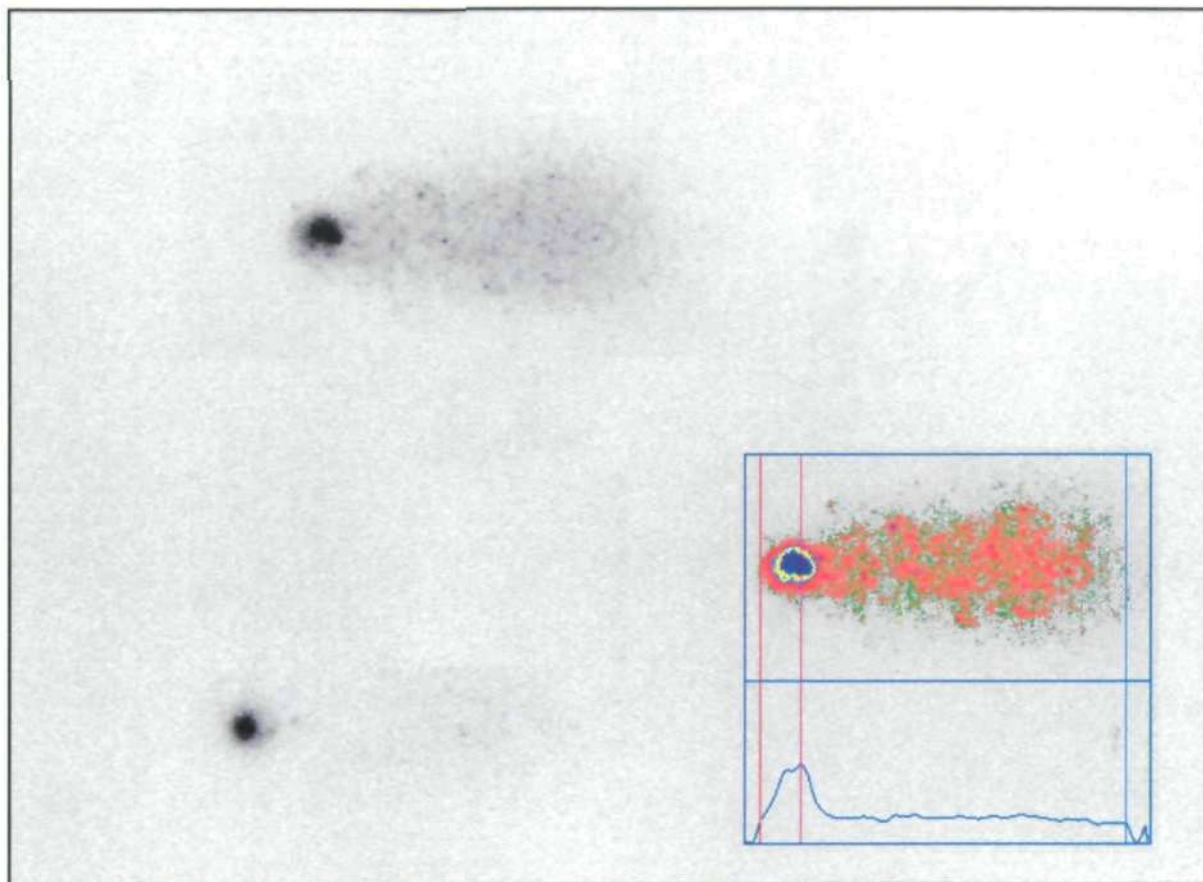


Ontwikkeling van de neutraal rood retentie test en de cometassay in de Driehoeksmossel (*Dreissena Polymorpha*), de vedermuggen larf (*Chironomus riparius*) en de watervlo *Daphnia magna*.



Auteur:
Martijn van der Veen
Juli 2001

In samenwerking met:
Piet den Besten
Kees Tuk

Werkdocument RIZA
nr. 2001.135X

Samenvatting

Biomarkers zijn testen die kijken naar suborganismale effecten van stress.

Omdat biomarkers over het algemeen eerder effecten van toxische stoffen laat zien dan bij bioassays, en doordat ze sneller zijn uit te voeren zijn (kortere blootstelling duur) zijn biomarkers relatief goedkope en bruikbare testen.

In dit rapport worden 2 biomarkertesten besproken, te weten de cometassay en de neutraal rood retentie test. De cometassay is een biomarker methode die genetische schade in de vorm van DNA strengbreuken meet in individuele cellen. De neutraal rood retentie test is een biomarker die de lysosomale stabiliteit meet. De parameter welke gemeten wordt is de zogenaamde retentie tijd. Het meten van de neutraal rood retentie tijd stopt op het moment dat 80 procent van de cellen neutraal rood lekt vanuit de lysosomen naar het cytoplasma. De tijd totdat dit gebeurt ten opzichte van een controle preparaat in een maat voor de fysieke conditie van het dier.

Deze biomarker testen zijn geprobeerd toe te passen bij 3 evertebraten. In dit verslag wordt de ontwikkeling en toepassing van de 2 biomarkers besproken met 2 nieuwe soorten, te weten de driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) en de vedermug (*Chironomus riparius*). Tevens is er gekeken naar de DNA schade reparatie kinetiek van de watervlo *Daphnia magna*.

Uit dit en eerder onderzoek met de cometassay komt naar voren dat de gemeten respons beïnvloed wordt door een heel scala aan dynamische processen. De cometassay bleek bij blootstellingsexperimenten met *Daphnia magna* en *Dreissena polymorpha* significante verhoging van DNA schade ten opzichte van de controle preparaten te laten zien bij subletale concentraties van bijvoorbeeld 21 µg/l 4-NQO. De $LOEC_{comet}$ van *Daphnia magna* van 4-NQO lag een factor 16 lager dan de LC50 bij een blootstellingduur van 2 dagen. Voor de driehoeksmossel lag het verschil tussen de $LOEC_{comet}$ en de LC50 voor de zelfde stof op een factor 109, maar hierbij is gebruik gemaakt van een geëxtrapoleerde LC50. Verder is aangetoond dat *Daphnia magna* DNA schade kan repareren.

De pogingen die gedaan zijn om de cometassay toe te passen op de vedermug *Chironomus riparius* zijn tot nu toe mislukt. Dit kwam door het uitblijven van een geschikte methode om voldoende cellen in oplossing te krijgen. Verdere testen met bijvoorbeeld Chitinase zijn wenselijk.

Het principe van de neutraal rood retentie test is interessant en bruikbaar, maar de gebruikte meetmethode is nog te onnauwkeurig bij zowel *Daphnia magna* en *Dreissena polymorpha*. De verandering van kleur bij terug lek van neutraal rood van het lysosoom naar het cytosool is moeilijk te zien. Verder onderzoek is nodig om de test betrouwbaarder te maken.

Inhoud

1. Inleiding

- 1.2 De Neutraal rood retentie test
- 1.3 DNA Schade en reparatie
- 1.4 De Cometassay of single cell gel electroforese
- 1.5 Gebruikte soorten
 - 1.5.1 *Daphnia magna* (Watervlo)
 - 1.5.2 *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)
 - 1.5.3 *Chironomus riparius* (Vedermug)
- 1.6 Doelstellingen

2 Materiaal en methoden

- 2.1 Het houden en kweken van de organismen.
 - 2.1.1 *Daphnia magna* (Watervlooi)
 - 2.1.2 *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)
 - 2.1.3 *Chironomus riparius* (Vedermug)
- 2.2 Blootstelling voor Cometassay en neutraal rood retentie test
 - 2.2.1 In vivo blootstelling van *Daphnia magna* (Watervlo)
 - 2.2.2 In vivo blootstelling van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)
 - 2.2.3 In vitro blootstelling van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)
- 2.3 Gebruikte stoffen
- 2.4 Cel isolatie
 - 2.4.1 Celsuspensie verkrijgen met *Daphnia magna* (Watervlo)
 - 2.4.2 Celsuspensie verkrijgen met *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)
 - 2.4.3 Celsuspensie verkrijgen van *Chironomus riparius* (Vedermug) larven
 - 2.4.4 Controle vitaliteit cellen
- 2.5 De Cometassay
 - 2.5.1 Neutraal rood retentie test
 - 2.5.2 DNA reparatie experiment met de *Daphnia magna* (Watervlo)
 - 2.5.3 Toxiciteit proef met de *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)
 - 2.5.4 De aanwezigheid van lysosomen in cellen van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)
- 2.6 Statistiek

3 Resultaten.

- 3.1 Cometassay met *Daphnia Magna* (Watervlo)
 - 3.1.2 DNA reparatie experiment
- 3.2 Celvitaliteit metingen aan de celsuspensie van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)
- 3.3 Cometassay met de *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)
 - 3.3.1 Cometassay na in vivo blootstelling van *Dreissena polymorpha* aan 4-NQO
 - 3.3.2 Cometassay na in vitro blootstelling van *Dreissena polymorpha* aan 4-NQO
 - 3.3.3 Cometassay na in vivo blootstelling van *Dreissena polymorpha* aan EMS
- 3.4 Vergelijking tussen alle controles van in vivo experimenten uitgevoerd met *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)
- 3.5 Toxiciteit proef met *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)
- 3.6 Celsuspensie verkrijgen van weefsel uit *Chironomus riparius* (Vedermug) larven
- 3.7 De aanwezigheid van lysosomen in cellen van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

4 Discussie en conclusies

4.1 Cometassay met *Daphnia Magna*

4.1.1 DNA reparatie test met de *Daphnia magna*

4.2 Cometassay met de *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

4.2.1 Cometassay na in vivo blootstelling van *Dreissena polymorpha* aan 4-NQO

4.2.2 Cometassay na in vitro blootstelling van *Dreissena polymorpha* aan 4-NQO

4.2.3 Cometassay na in vivo blootstelling van *Dreissena polymorpha* aan EMS

4.3 Vergelijking tussen alle controles van in vivo experimenten uitgevoerd met *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

4.4 Toxiciteit proef met *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

4.5 Celvitaliteit metingen aan de celsuspensie van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

4.6 Celsuspensie verkrijgen van weefsel uit *Chironomus riparius* (Vedermug) larven

4.7 De aanwezigheid van lysosomen in cellen van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

4.8 Een blik vooruit

4.8.1 Mogelijkheden van de cometassay

4.8.2 Mogelijkheden van de Neutraal rood retentie test

5 Literatuur

6 Bijlagen

1. Inleiding

In de ecotoxicologie wordt onderzoek gedaan naar het lot en de effecten van toxische stoffen in ecosystemen om zo te weten te komen hoe een stof de structuur en het functioneren van populaties, levensgemeenschappen en ecosystemen beïnvloedt.

Ecotoxicologische testen die meteen effecten proberen te meten op populatie of hoger niveau zijn moeilijk uit te voeren. Dit in verband met de complexiteit van de experimenten, in zowel de uitvoering als interpretatie. Tel daarbij de hoge kosten op, en het is duidelijk waarom het gebruikelijk is om zogenaamde single species testen (o.a. bioassays) uit te voeren. Bij deze single species testen wordt gekeken naar effecten van toxische stoffen op het niveau van individuen. Hierbij wordt vooral gekeken naar de parameters sterfte, gewichtsveranderingen en reproductie. Aan de hand van deze gegevens worden soms voorspellingen gedaan over effecten van de geteste toxische stoffen op een populatie of levensgemeenschap.

Om een betere kijk te krijgen op de werkingsmechanismen van toxische stoffen op organismen, en om effecten van toxische stoffen sneller te meten bij meestal lagere concentraties, worden er steeds meer experimenten uitgevoerd die kijken naar suborganismale effecten. Testen met suborganismale effecten als parameter worden biomarkers genoemd.

Onder biomarker wordt in dit verslag het volgende verstaan: Elke biologische respons op toxische stoffen op het suborganismaal niveau, gemeten in het organisme of in zijn producten (urine, uitwerpselen, haren, veren, enz), die een afwijking aangeven van het normale niveau, dat niet kan worden gemeten aan een intact organisme (Van Gestel en Brummelen, 1996). De term biomarker omvat biochemische, fysiologische, histologische en morfologische parameters die de "gezondheid" van het organisme omvatten.

Omdat biomarker testen over het algemeen eerder effecten van toxische stoffen laten zien dan bioassays, en doordat ze sneller zijn uit te voeren, (kortere blootstellingsduur) zijn biomarker testen relatief goedkoop en bruikbaar.

Het grote probleem met biomarker testen is echter het interpreteren van de uitkomsten. Als er bij een cometassay DNA schade wordt gemeten, zegt dit niet direct iets over de effecten hiervan op de populatie of zelfs maar op het individu. Zulke verbanden zijn moeilijk te leggen en vereisen een gedegen kennis van de fysiologische werkingen van de onderzochte parameter en de processen hieromheen.

Een methode die in veel gevallen bruikbaar is om effecten op suborganismaal niveau te extrapoleren naar effecten op individu niveau, is het kijken naar de energie huishouding van het organisme. Door de gemeten effecten in een biomarker test om te zetten naar effecten op de energie huishouding kunnen voorspellingen worden gedaan over de effecten van bijvoorbeeld DNA schade op de reproductie en groei van het hele organisme. Maar zoals al eerder aangegeven is hiervoor wel fysiologische kennis van, in dit geval, DNA schade en reparatie nodig (meer hierover in Scriptie "Ecotoxicologie, het probleem van de extrapolatie", van der Veen, 2000).

Het gebruik van biomarker testen kan tevens inzicht leveren in de werkingsmechanismen van stoffen.

In oppervlaktewater kunnen de huidige kortdurende bioassays (Bacteriën, algen, crustacea, vis) pas toxische effecten meten bij geconcentreerde monsters. Dit geeft aan dat de toxiciteit in het oppervlaktewater de laatste tijd tot onder een acuut niveau is teruggedrongen. Dit is op zich een goed teken, maar geeft ecotoxicologen wel een probleem. De effecten van lagere concentraties zijn op lange termijn niet of nauwelijks te meten met acute bioassays. Chronische bioassays zijn vaak te duur en te omslachtig om op grote schaal te worden toegepast.

Voor het snel screenen van de overgebleven toxiciteit in het oppervlaktewater is een verfijnde methode (biomarker test) wenselijk die snel en goedkoop effecten laat zien van toxische stoffen op een proces in een organisme die te relateren is aan effecten op niveau van een organisme.

Hieronder volgen de criteria die op het RIZA van belang worden geacht voor een bruikbare biomarker bepaling als uitbreiding en/of aanvulling van testen zoals deze nu op het RIZA worden uitgevoerd:

- De biomarker moet te implementeren zijn in een bioassay, bij voorkeur op een reeds op het RIZA gebruikte bioassay. De biomarker is dan bijvoorbeeld een eindpunt van een bioassay, waarbij een organisme wordt blootgesteld aan een milieu monster. Indien mogelijk moet de biomarkerbepaling ook kunnen worden uitgevoerd in organismen die in het veld kunnen worden verzameld.
- De biomarker moet bruikbaar zijn in evertebraten. De wet en regelgeving op het gebied van het gebruik van gewervelde dieren voor toxicologische testen wordt steeds strenger. Dit zal het gebruik van deze dieren in testen die ongerief veroorzaken steeds moeilijker maken.
- Bij WSC wil men onderzoek doen naar de relatie tussen de respons op (sub)-cellulair niveau en de 'fitness' van het dier. Vooral de relatie tussen de respons en effecten op voortplanting en populatiegroei parameters worden hierbij belicht, om zo een kennis hiaat die bestaat op te vullen. Het moet dus mogelijk zijn om de uitkomsten van biomarker bepalingen in individuen te relateren aan bijvoorbeeld voortplantingssucces in een chronische test.

Het combineren van deze criteria heeft in eerste instantie geleid tot de keuze van 2 biomarker testen, te weten de Cometassay en de Neutraal rood Retentie test. Deze biomarker testen zijn gepoogd toe te passen en te ontwikkelen bij 3 evertebraten. Eerst zijn de biomarker testen ontwikkeld en toegepast op de watervlo *Daphnia magna* (Tuk, 1999). In dit verslag wordt de ontwikkeling en toepassing van de 2 biomarkers besproken met 2 nieuwe soorten, te weten de driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) en de vedermug (*Chironomus riparius*). Verder zijn er nog aanvullende bepalingen gedaan met de watervlo *Daphnia magna*.

Al deze organismen worden al gebruikt in bioassays en/of ecologisch onderzoek op het RIZA.

1.2 De Neutraal rood retentie test

Iedere eukariotische cel bevat een aantal blaasjessystemen. Deze systemen zorgen onder meer voor het transport van in het ruw endoplasmatisch reticulum geproduceerde eiwitten naar het celmembraan. Een ander blaasjessysteem zorgt voor de 'routing' van opgenomen deeltjes en stoffen (gefagocyteerd en geëndocyteerd) naar de organellen die de spijsvertering van de cel verzorgen, lysosomen genoemd in dierlijke cellen. Hier versmelten de zogenaamde fagosomen met de lysosomen tot een fagolysosoom.

Lysosomen zijn zure organellen die een grote hoeveelheid verteringsenzymen bevatten. Lysosomen variëren in vorm en grote, en enkele honderden kunnen aanwezig zijn in een cel. Primaire lysosomen zijn ruw rond en bevatten geen zichtbare deeltjes of celmembraan resten. Secundaire lysosomen (fagolysosoom) (zie fig. 1.1 bijlage) zijn groter en onregelmatig van vorm en bevatten membraanresten die worden verteerd. Lysosomen bevatten o.a. de volgende stoffen: hydrolases zuur, enzymen die polymeren afbreken tot monomere sub onderdelen; fosfatase, verwijdert fosfaat groepen van mononucleotides; en stoffen zoals phospholipiden. Nucleases bijvoorbeeld breken RNA en DNA af in mononucleotide bouwstenen; proteases breken eiwitten en peptides af en weer andere enzymen breken complexe polysaccharides en lipiden in kleinere stukjes.

Alle lysosomale enzymen hebben hun optimale werking bij een lage pH. Om de werking van de enzymen te behouden wordt de pH van een lysosoom gereguleerd op 4.8. Dit wordt gedaan door protonenpompen in het lysosomale membraan. De lage pH zorgt voor het ontvouwen van eiwitten, die hierdoor beter af te breken zijn door de lysosomale eiwitten. Als de inhoud van een lysosoom in het cytosol wordt geleeft, waar een pH van ongeveer 7 heerst, zal er geen afbraak plaatsvinden van cytoplasmatische componenten (Lodish *et al*, 1995).

Neutraal rood is een zwak basische stof die passief over het membraan kan diffunderen. In het lysosoom wordt door het zure milieu een proton (H^+ ion) opgenomen. Dit weerhoudt het neutraal rood om weer over het membraan te diffunderen. Omdat de protonen pomp nieuwe H^+ ionen het lysosoom in blijft pompen blijft de pH gradiënt gehandhaafd, en kan alle neutraal rood die in de cel komt geprotoneert worden. De geprotoneerde neutraal rood accumuleert hierdoor in de lysosomen (fig. 1.2 bijlage). Op een gegeven moment is de concentratie geprotoneerde neutraal rood zo groot in de cel dat deze stof toxische effecten veroorzaakt. Het milieu in de organellen kan niet meer worden gehandhaafd en de membranen van de lysosomen raken lek. De neutraal rood zal dan versneld uit de lysosomen lekken en het cytosool rood kleuren. In een gezonde cel met goed gesloten membranen en goed werkende protonenpompen zal het vrij lang duren voordat er lek van neutraal rood uit de lysosomen optreedt. Een cel die echter aan een toxische stof is blootgesteld of waar bijvoorbeeld de homeostase van het organisme waar de cel in leeft al een tijd onder druk staat door een toxisch effect, zal een kortere retentietijd van neutraal rood laten zien (hier de tijd die verstreken is tot dat 80 procent van de cellen neutraal rood lekt vanuit de lysosomen naar het cytoplasma laat zien). Permeatie van de membranen van de cel (hierbij worden ook membranen van celorganellen bedoeld) en remming van de protonenpompen zijn voorbeelden van toxische effecten die een verlaagde retentietijd van neutraal rood tot gevolg hebben.

Alle dierlijke cellen horen lysosomen te hebben. Alleen hebben sommige cellen meer lysosomen dan anderen. Cellen die veel fagocyteren, zoals cellen in de darmwand en levercellen, en hemolymfe cellen bevatten naar verhouding veel lysosomen.

1.3 DNA Schade en reparatie

Genotoxische stoffen kunnen een opeenvolging van genetische veranderingen veroorzaken die uiteindelijk kunnen leiden tot ongecontroleerde celdeling (kanker) (Weiberg, 1989). Genotoxische stoffen kunnen nog andere toxische responses veroorzaken zoals bijv. overerfbare defecten door mutaties in de voortplantings cellen en/of genetische fouten in ongeboren jongen. Effecten op de reproductie van organismen kunnen een grotere bedreiging zijn voor populatie parameters dan de carcinogene effecten (Mitchelmore en Chipman, 1998). Een veelvoud van mutaties veroorzaakt door genotoxische stoffen bleken de relatieve fitness van verscheidene onderzochte organismen te verminderen (De Flora, 1991). Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de hoge energetische kosten van het DNA repareren. Hierdoor is er minder energie over voor bijv. onderhoud en reproductie. Aan de andere kant is het niet ondenkbaar dat genotoxische stoffen in niet te hoge concentraties de genetische diversiteit van een populatie kan verhogen juist door een verhoogde mutatie ratio. Maar ook niet genotoxische stoffen kunnen in principe een verhoging van het aantal DNA strengbreuken laten zien. De energetische kosten van het repareren van schade door toxische stoffen kunnen er toe leiden dat er te weinig energie beschikbaar is voor de reparatie van achtergrond DNA schade.

DNA strengbreuken worden toegeschreven aan drie verschillende gebeurtenissen. Rechtstreekse DNA schade door contaminanten of vrije zuurstofradicalen, DNA reparatie en apoptose ofwel geprogrammeerde celdood (Eastman & Barry, 1992). De natuurlijke achtergrond schade aan baseparen in een organisme kan oplopen tot 100.000 bases per cel per dag (Freidberg, 1985). Deze schade wordt voornamelijk veroorzaakt door vrije radicalen die ontstaan tijdens de gewone metabolische cycli. Ook spontane gebeurtenissen kunnen de oorzaak zijn van DNA fouten. Het spontane afsplitsen van een amino groep (-NH₂) van de basen of het wegvallen van gehele purine basen (Adenine en Guanine) zijn hier voorbeelden van.

De meeste DNA schade resulteert niet rechtstreeks in strengbreuken, maar in veranderingen in en aan base paren. Deze fouten worden gerepareerd door een DNA reparatie mechanisme. De volgorde waarin een reparatie wordt gedaan is als volgt: herkennen van de fout, het knippen in een stuk DNA streng waar de fout inzit door een endonuclease en het verwijderen van dat stuk DNA door een exonuclease. Nu blijft een stuk enkelstrengs DNA over dat door polymerase en ligase als "readingframe" wordt gebruikt om het gedeelte waar eerst de fout inzat weer correct te maken (fig. 1.3 bijlage). Als tijdens dit proces het DNA wordt gelyseerd zodat enkelstrengs DNA ontstaat, zal een reparatieplek waar net geknipt is leiden tot enkelstrengs DNA fragmenten. Deze strengbreuken zullen ook invloed hebben op de gemeten respons met de cometassay methode (zie bijvoorbeeld Speit & Hartman, 1995). Dit mechanisme zou voor een groot deel debet zijn aan de waargenomen DNA strengbreuken in de cometassay.

Apoptosis of geprogrammeerde celdood is een mechanisme van cellen om zichzelf te vernietigen. DNA wordt tijdens dit proces geknipt door een endonuclease. Dit resulteert in dubbelstrengs DNA breuken met een lengte van 180 base paren of veelvoud hiervan (Eastman & Barry, 1992).

Eastman en Barry geven in een artikel over de oorsprong van DNA breuken aan dat veel van de in eerdere experimenten waargenomen DNA strengbreuken werden veroorzaakt door processen die te maken hebben met geprogrammeerde celdood (Eastman & Barry, 1992).

1.4 De Cometassay of single cell gel electroforese

Het is bekend dat blootstelling aan genotoxische en carcinogene stoffen kan leiden tot een verminderde DNA integriteit. Hierdoor wordt er steeds meer gekeken naar methoden die strengbreuken in DNA zichtbaar kunnen maken. Deze kunnen dan als gevoelige indicator dienen voor genotoxiciteit (Shugart, 1990)

De cometassay is een biomarker methode die DNA strengbreuken zichtbaar kan maken. Deze methode is toegespitst op het detecteren van genotoxische effecten. Het ontstaan van DNA strengbreuken correleert goed met de mutagene en carcinogene eigenschappen van verschillende geteste stoffen (Sina *et al*, 1983)

De cometassay is een biomarker methode die genetische schade in de vorm van DNA strengbreuken meet in individuele cellen. De methode werd geïntroduceerd door Osteling en Johanson in 1984. De cometassay is een snelle, gevoelige, relatief simpele en visuele methode om DNA schade te meten en te bestuderen in eukariotische cellen. De cometassay gaat uit van het gegeven dat genotoxische stoffen DNA strengbreuken veroorzaken. Hoe genotoxischer de stof of hoe hoger de concentraties stof hoe meer strengbreuken er kunnen worden verwacht. Om dit te visualiseren is er een methode ontwikkeld om deze strengbreuken zichtbaar te maken. Als er sprake is van DNA strengbreuken kan dit worden gezien als een soort staart aan de ronde celkern. Het geheel heeft dan wel wat weg van een komeet (zie fig. kaft), vandaar de naam "Cometassay". Men gaat er van uit dat hoe langer de staart is, hoe meer korter de DNA fragmenten zijn.

De door Singh *et al* in 1988 geïntroduceerde alkaline (basische pH>13) condities van de electroforese buffer zorgde voor het ontwinden en enkelstrengs worden van het DNA. Nu konden enkelstrengs breuken worden gemeten in plaats van alleen dubbelstrengs DNA streng breuken in de oorspronkelijke methode. Omdat er nu sneller en meer DNA fragmenten ontstaan die in het elektrisch veld tijdens de electroforese kunnen migreren uit de kern ontstaat er eerder een "staart" van DNA fragmenten die gemeten kan worden. Hierdoor is de cometassay onder basische omstandigheden gevoeliger dan de oorspronkelijke methode die alleen dubbelstrengs breuken liet zien. De basische condities zorgen er ook voor dat het aanwezige RNA in de cel wordt afgebroken. Hierdoor vind je geen RNA terug in de eventuele staart (Singh *et al*, 1988).

Omdat er naar DNA schade in individuele cellen wordt gekeken is het mogelijk om te kijken of de mate van DNA schade gelijk is in alle onderzochte cellen. Hierdoor kan variatie in respons van verschillende cellen worden onderzocht.

Met de cometassay onder alkaline omstandigheden kunnen 0.1 DNA streng breuken per 10^9 dalton worden gemeten (Gedik *et al.*, 1992).

Het voordeel van de cometassay is dat de methode in principe toepasbaar is op alle eukariotische organismen, als er maar een "single cel" suspensie verkregen kan worden met minimaal enkele honderden cellen. Maar het verkrijgen van een "single cel" suspensie is ook meteen de moeilijkheid bij het toepassen van de cometassay op nieuwe soorten. Dit geldt vooral voor invertebraten.

1.5 gebruikte soorten

1.5.1 *Daphnia magna* (Watervlo)

Het genus *Daphnia* (Cladocera:Daphnidae) is alom aanwezig in zoet water. *Daphnia*'s spelen een belangrijke rol in zoetwater voedselketens. Ze behoren tot de top consumenten van primaire producenten, en zijn zelf een belangrijke voedselbron voor zowel vertebrate als invertebrate predatoren. Zowel aan de ecologie en de fysiologie van de *Daphnia magna* is zeer veel onderzoek gedaan.

Daphnia's kunnen zich zowel geslachtelijk als ongeslachtelijk voortplanten. Het ontstaan van mannelijke *Daphnia*'s wordt bepaald door omgevingsvariabelen. Onder slechte omstandigheden worden er mannelijke *Daphnia*'s geboren zodat na geslachtelijke voortplanting de vrouwelijke *Daphnia*'s zogenaamde rust of winter eieren kunnen leggen. Deze eieren zijn veel beter bestand tegen slechte omstandigheden, zoals droogte, warmte of kou dan volwassen *Daphnia*'s. Onder normale omstandigheden plant de *Daphnia* zich parthenogenetisch voort. Ze ontwikkelen dan zogenaamde zomer eieren die in de broedzak worden uitgescheiden om daar te ontwikkelen.

De neutraal rood retentie test en de cometassay zijn al eerder toegepast op *Daphnia magna* (den Besten en Tuk, 2000).

1.5.2 *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

De *Dreissena polymorpha* behoort tot de klasse Bivalvia en orde Eulamellibrachia. *Dreissena polymorpha* heeft een gescheiden geslacht (Janssen *et al.*, 1965). Zowel het sperma als de eieren worden in het water afgezet, waarna de bevruchting van de eicellen kan plaatsvinden. Uit een bevruchte eicel ontwikkelt zich een zogenaamde veliger-larf. Deze larve is in staat zich actief door het water te bewegen met behulp van zijn trilhaarkrans (velum). Na een week is het stadium waarin zwemmen mogelijk is voorbij. De larve heeft dan inmiddels een schaal ontwikkeld waardoor hij naar de bodem zinkt. De schaal groeit uit tot een schelpje terwijl de trilhaarkrans verdwijnt. Om verder te ontwikkelen is het van belang dat de juveniele driehoeksmossel zich op een harde ondergrond bevindt. Op slappe modderige bodems is de kans op verstikking namelijk erg groot omdat ze daarin kunnen wegzinken of door waterbewegingen onder een laag met modder kunnen verdwijnen. In het begin zijn jonge mosselen nog in staat zich met hun "voet" voort te bewegen waarbij ze eventueel nog een geschikte plek kunnen zoeken om zich blijvend te kunnen vestigen. Dit laatste geschiedt doordat ze zich vastzetten met byssusdraden. De driehoeksmossel bezit een negatieve fototaxis. Ze zullen dus bij voorkeur donkere schaduwrijke plaatsen opzoeken. De kleur is zeer veranderlijk, van geelachtig tot

groenachtig bruin met talrijke donkere zigzagstrepen op de bovenzijde van de schelp. De vlakke onderzijde is eenkleurig en lichter van kleur.

Driehoeksmossel zijn "filterfeeders", ze voeden zich door voedseldeeltjes (dood of levend organisch materiaal) uit het water te zeven. De mannelijke en vrouwelijke exemplaren worden van elkaar onderscheiden door de kleur van de voet. De mannelijke exemplaren bezitten een oranje gekleurde voet, terwijl die van de vrouwelijke exemplaren wit is. (Leentvaar, 1943)

De geslachten zijn over het algemeen niet gelijktijdig geslachtsrijp. De mannelijke dieren zijn na ongeveer een jaar geslachtsrijp, de vrouwelijke meestal pas in het 2^{de} jaar.

De driehoeksmosselen zijn voor op het IJsselmeer overwinterende duikeenden soorten een belangrijke voedselbron. Ook een aantal vissoorten eten driehoeksmosselen. Verder wordt er onderzoek gedaan naar accumulatie van microverontreinigingen in driehoeksmosselen, in het ecotoxicologisch programma van MWTL. Tevens gebruikt de afdeling WSE van het RIZA de driehoeksmossel in biomonitorings programma's en biodiversiteit onderzoek.

Het toepassen van de cometassay en de neutraal rood retentie test op deze soort zou dus goed passen binnen de bestaande onderzoeken met de driehoeksmossel.

1.5.3 Chironomus riparius (Vedermug)

Chironomiden (Diptera:Chironomidae) zijn vooral bekend van de grote zwermen muggen naast of boven watermassa's of van de rode kronkelende larven in de waterbodem.

Er worden 4 stadia onderscheiden in de ontwikkeling van de muggenlarven. De eerste (L1) duurt 2 tot 5 dagen, afhankelijk van de omstandigheden. De tweede (L2) duurt 4 tot 5 dagen. De laatste twee ontwikkelingsstadia (L3 en L4) duren samen ongeveer 10 dagen. Na deze tijd komen de muggen uit, en vormen ze grote zwermen. De volwassen muggen leven ongeveer 2 tot 3 dagen waarin zij paren en eipakketen afzetten. Twee dagen na het leggen van het eipakket komen de eieren uit, en kan de cyclus weer opnieuw beginnen. Het larvale stadium van de cyclus beslaat ongeveer 16 tot 19 dagen, terwijl de volwassen muggen maar 2 tot 3 dagen leven.

De larven van deze vedermug soort zijn verzamelaars. De larven eten en vertoeven in de sedimentlaag. In deze laag zit het meeste organische materiaal van een waterbodem. De larven komen alleen in aërobe omstandigheden voor. Als de larven een bepaalde leeftijd (L3 = 6-10 dagen oud) hebben zullen ze een beschermende buis om hun lichaam gaan bouwen. De *Chironomus riparius* bouwt een buis van algen, waarbij het zijn monddelen gebruikt om bundels met algen te verzamelen. Door het uitscheiden van een speekselachtige stof kan hij stukken algen aan elkaar verbinden. De larven maken zo een soort zak waar ze uiteindelijk in gaan zitten. Het hele proces neemt 1 tot 3 uur in beslag. (Edgar en Meadows, 1969)

De activiteit van muggenlarven in het sediment heeft grote invloed op de chemie van zowel het sediment als het water. Het vrijkomen van fosfaat uit zuurstof houdend sediment uit lake Mendota, Wisconsin gaat bijv. omhoog door de activiteit van zowel *Chironomus riparius* larven als *Chironomus tentans* larven. Het vrijkomen van fosfaat was onder anderen gerelateerd aan de dichtheid van larven in het monster en hun

biomassa. De auteur van het artikel concludeerde dat de chironomide larven een significant effect kunnen hebben op de beschikbaarheid van fosfaat vanuit aërobe bodem sediment, en dat de mate waarin dit gebeurt verschilt in de verschillende seizoenen (Gallepp, 1979). *Chironomus riparius* wordt op veel verschillende plaatsen gevonden. De *Chironomus riparius* is in Nederland bijvoorbeeld onder meer waargenomen in brak water (Parma en Krebs, 1977)

De *Chironomus riparius* wordt gebruikt in verschillende ecotoxicologische en toxicologische experimenten. Bij muggenlarven verzameld in het veld, wordt bijvoorbeeld gekeken naar kaakafwijkingen. Deze zouden duiden op vervuilde levensomstandigheden. Met gekweekte muggenlarven worden bioassays uitgevoerd om de overleving van de muggen larven te bepalen onder vervuilde omstandigheden. Deze testen worden allemaal uitgevoerd op het RIZA. Hier wordt ook een *Chironomus riparius* kweek onderhouden.

Als uitbreiding en aanvulling van deze toepassingen met de *Chironomus riparius* zou het wenselijk zijn om met deze soort de cometassay en neutraal rood retentie test uit te voeren. Het toepassen van de cometassay en de neutraal rood retentie test op deze soort zou verder goed aansluiten binnen de bestaande onderzoeken met de *Chironomus riparius* op het RIZA.

1.6 Doelstelling

Het doel van dit onderzoek is primair het kunnen toepassen van de 2 biomarker testen op 2 nieuwe diersoorten. Hierbij wordt vooral gekeken naar eventuele variatie in respons. Het finetunen van de biomarker (o.a. het implementeren van een beeldanalyse systeem voor de cometassay) is tevens een belangrijke doelstelling. In dit rapport wordt de bruikbaarheid en de toepassingsmogelijkheden van de twee biomarker testen besproken. Er wordt bijvoorbeeld gekeken naar de gevoeligheid van de biomarker testen ten opzichte van andere ecotoxicologische testen en verschillen in gevoeligheid van de onderzochte organismen onderling.

Verder is de Comet assay toegepast bij *Daphnia magna* om een indruk te krijgen van de kinetiek/herstelsnelheid van het repareren van DNA-schade.

2 Materiaal en methoden

2.1 Het houden en kweken van de organismen

2.1.1 *Daphnia magna* (Watervlo)

De *Daphnia*'s die voor de testen gebruikt werden kwamen uit de *Daphnia magna* kweek van het RIZA. Deze kweek wordt volgens de AOCE/02 S.O.P. onderhouden. De *Daphnia*'s worden gehouden in Elendt M4 water (zie bijlage voor samenstelling) in een klimaatkamer bij 20 °C en een dag/nacht ritme heeft van 12 uur licht en 12 uur donker. De *Daphnia*'s werden gevoerd met een suspensie van *Chlorella pyrenoidosa*. Dit gebeurde door 1 maal daags ongeveer $1.25 \cdot 10^9$ cellen aan 2,5 liter kweekmedium toe te voegen waarin 50 dieren zaten.

2.1.2 *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

De driehoeksmosselen werden ongeveer een week voor een proef verzameld uit het IJsselmeer. De plek waar de mosselen werden verzameld ligt in de eerste bocht van de dijk van Lelystad naar Enkhuizen.

Op het RIZA werden de mosselen overgebracht naar een plastic aquarium met een inhoud van 10 liter die ongeveer voor de helft werd gevuld met DSW (Dutch standard water, voor samenstelling zie bijlage) in een klimaatcel van 20 °C. Het dag-nacht ritme was 12 uur licht 12 uur donker. In verband met de verderop beschreven negatieve fototaxis kan een langere donkere periode geen kwaad, maar dit is niet toegepast. In een bak werden ongeveer 70 tot 100 mosselen gehouden.

De mosselen werden 1 keer per dag gevoerd met 4 ml van een algen oplossing (*Chlorella*) die bestond uit ongeveer $2,78 \cdot 10^{11}$ cellen. In het weekend wordt op zaterdag een dubbele hoeveelheid toegevoegd. Bij het houden van mosselen is het van belang dat het water voldoende belucht wordt. Uit observaties kwam naar voren dat als de beluchting niet hard genoeg stond de algen te snel neersloegen op de bodem van het aquarium. De algen waren hierdoor niet langer beschikbaar als voedsel voor de mosselen. Als de mosselen niet in een experiment werden gebruikt werd de bak elke week verschoond.

2.1.3 *Chironomus riparius* (Vedermug)

De muggenlarven die voor de experimenten worden gebruikt komen uit de *Chironomus riparius* kweek van het RIZA. Deze kweek wordt volgens de AOCE/06 S.O.P. onderhouden. De muggenlarven worden gehouden in 100% DSW (Dutch standard water, voor samenstelling zie bijlage) en vanaf hun L2 3x per week gevoerd met ongeveer 100 mg fijngemalen Trouvit (nummer 00, Trouw & Co, Putten) per bak. In elke bak zit 2,5 liter DSW. De kweek staat in een klimaatkamer bij een temperatuur van 20 °C, met een dag-nacht ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. De larven die voor de experimenten gebruikt zijn kwamen rechtstreeks uit de *Chironomus riparius* kweek.

2.2 Blootstelling voor de cometassay en neutraal rood retentie test

2.2.1 In vivo blootstelling van *Daphnia magna* (Watervlo)

Er werden per concentratie 20 *Daphnia*'s ingezet die jonger waren dan 24 uur. De *Daphnia*'s werden bij 20 °C blootgesteld in glazen potten van ± 750 ml in 300 ml Elendt M4 aan de volgende concentraties 4-NQO: 0, 21, 47, 100, 210 en 470 µg/L. Tijdens de blootstelling werd niet gevoerd. Na 48 uur blootstelling werden de *Daphnia*'s uitgehaald en verder gebruikt in de cometassay.

2.2.2 In vivo blootstelling van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

De mosselen werden voor de in vivo blootstelling aan 4-NQO en EMS in glazen potten blootgesteld. De toxische stoffen werden in 500 ml DSW opgelost. De potten werden gehouden op 20 °C bij een dag nacht ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. De oplossing werd constant belucht met lucht dat door een microfilter van 0.45 µm werd gezuiverd. Er werden 3 mosselen per concentratie (per pot) ingezet. 4-NQO werd toegevoegd uit een stock oplossing van 1 mg 4-NQO per ml DMSO. In alle testen werd evenveel DMSO toegevoegd (160 µl) om zo eventuele effecten van DMSO op de uitslag te reduceren. Voor de blootstelling aan toxische stoffen worden de mosselen gespoeld en met een papertje afgeveegd. Ook worden alle eventuele aanwezige eikapsels van insecten en algen slierten verwijderd. Tijdens de blootstelling werd niet gevoerd. Bij de uitgevoerde experimenten zijn de volgende concentraties van 4-NQO en EMS gebruikt: 4-NQO: van 0 tot 300 µg/l; EMS : 0 tot 320 mg/l

2.2.3 In vitro blootstelling van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

Voor de in vitro blootstelling werden drie mosselen uit de kweek gehaald, waarvan van elk dier beide kieuwbogen in celsuspensie werden gebracht (zie "Celsuspensie verkrijgen met *Dreissena polymorpha*" par. 2.4.1). De 4-NQO werd opgelost in 1/3 PBS buffer plus Ca en Mg. De blootstelling vond plaats op de agarose laag. 200 µl vloeistof per concentratie werd op de preparaten gebracht op het moment dat de dekglasjes er af waren gehaald na het aanbrengen van de tweede laag agarose (zie "De cometassay" par. 2.4.4). De blootstellingduur was twee uur en vond plaats bij een temperatuur van 5 °C in het donker.

2.3 Gebruikte stoffen

- 4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) van Sigma. Art nr. N-8141. De doseringen van deze stof werden gemaakt vanuit een stockoplossing van 4-NQO opgelost in DMSO.
- Ethylmethaansulfonaat (EMS) van Sigma. Art nr. M-0880. Dit is een vloeistof met een soortelijk gewicht van 1.14 g/ml. Voor het maken van de doseringen werd de vloeistof direct in de juiste hoeveelheid in het medium verdund.

2.4 Cel isolatie

2.4.1 Celsuspensie verkrijgen uit *Daphnia magna* (Watervlo)

Voor een celsuspensie van *Daphnia* cellen zijn per concentratie 20 jonge *Daphnia*'s gebruikt. De *Daphnia*'s werden verzameld in een klein volume en overgebracht naar een plastic petrischaal. Hierin werden de dieren één maal gespoeld met *Daphnia* buffer met 0.1% BSA (samenstelling *Daphnia* buffer zie bijlage).

Hierna worden de dieren weer in een zo klein mogelijk volume opgenomen en overgebracht naar een 150 µm gaasje dat over een eppendorfje is gespannen. Tot alle concentraties gedaan zijn, worden de eppendorfjes op ijs bewaard. De buisjes worden kort afgedraaid door de tot 4 °C voor gekoelde Hettich centrifuge tot 2500 rpm te laten komen en hierna af te laten remmen. Na het toevoegen van 1 druppel gekoelde DBSA (*Daphnia* buffer met 0.1% BSA) op het gaasje, worden de *Daphnia*'s met een stampertje die van een pipetpunt is gemaakt door het gaasje gewreven. Na het toevoegen van 4 druppels DBSA op het gaasje word weer even gecentrifugeerd. Nu werd de suspensie onder in het eppendorfje overgebracht naar een nieuw epje en het geheel 5 min bij 1000 rpm afgedraaid. Nadat het supernatant is verwijderd worden de cellen in de ongeveer overgebleven 10 µl geresuspendeerd. Nu wordt 30 µl gekoeld DBSA toegevoegd. De suspensie wordt hierna weggezet op ijs.

Met de nu verkregen celsuspensie van de *Daphnia magna* kan de procedure zoals onder het kopje "de cometassay" word beschreven in worden gedaan.

2.4.2 Celsuspensie verkrijgen uit *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

Om een celsuspensie te verkrijgen is gekozen om voor de celsuspensie kieuwbogen te isoleren. Deze keuze is gemaakt omdat dit orgaan door zijn functie constant in contact staat met het water en de daarin aanwezige toxische stoffen.

Om te onderzoeken bij welke osmolariteit de cellen zich het beste voelen, is in buffers met verschillende osmolariteit de vitaliteit en het aantal van de cellen gecontroleerd door middel van een Trypaanblauwkleuring (zie "controle vitaliteit cellen" par. 2.4.4 voor meer info). 1 PBS (Phosphate Buffer Saline) met Mg^{2+} en Ca^{2+} heeft als basis gediend voor deze test (voor samenstelling zie bijlage). PBS heeft een osmolariteit van 320 mOsmoll per liter. Bij deze osmolariteit voelen menselijke cellen zich optimaal. Om de osmolariteit van een optimale buffer voor de cellen te bepalen is een reeks van DSW, ¼ PBS, ½ PBS, ¾ PBS en 1 PBS ingezet. Na het verkrijgen van de celsuspensies is de vitaliteit van de cellen bij de verschillende osmotische waarden bepaald met de trypaanblauw kleuring. De resultaten hiervan worden later besproken,

maar het bleek dat de cellen de hoogste vitaliteit lieten zien tussen de ¼ PBS en een ½ PBS. Er is uiteindelijk gekozen om 1/3 PBS te nemen als optimale buffer sterkte. De osmolariteit hiervan is 107 mOsmol/l.

Om de celsuspensie te verkrijgen worden 1 of 2 kieuwbogen uit 1 of meerdere driehoeksmosselen geïsoleerd. Deze worden in een buisje met 5 ml mosselbuffer (1/3 PBS) waarin 0.125 % collagenase is opgelost geplaatst. Het geheel wordt nu 50 minuten stevig geschud. Hierna wordt de suspensie door een 100 µm gaasje gefilterd. De opgevangen celsuspensie wordt vervolgens 5 minuten gecentrifugeerd met 1500 rpm (4 °C). Hierna wordt de buffer met collagenase afgegoten en worden de cellen geresuspendeerd in 2,5 ml koude mosselbuffer met 0.1 % BSA (Bovine Serum Albumin). Bij het gebruik van 3 kieuwbogen bleek het resuspenderen in 2.5 ml buffer het optimum om de juiste hoeveelheid cellen in de preparaten te krijgen.

Nu kan met behulp van een telkamer (bijvoorbeeld Bürker) de celconcentratie en vitaliteit worden bepaald. Voor meer informatie hierover zie "controle vitaliteit cellen".

2.4.3 Celsuspensie verkrijgen uit *Chironomus riparius* (Vedermug) larven

Om de cometassay uit te kunnen voeren met de larven van *Chironomus riparius* is de eerste noodzakelijke stap het verkrijgen van een celsuspensie met voldoende losse cellen. Hiertoe zijn verschillende pogingen ondernomen.

Als eerste zijn 10 L4 larven met prepareer naalden uit elkaar gescheurd en tot 60 min in een 0.125 % collagenase oplossing in 5 ml 1 DB+ BSA (osmolariteit DB 132 mOsmol/l) geschud. Hierna is hetzelfde geprobeerd met 0.125% Trypsine. Toen deze enzymatische methoden niet toereikend bleken om voldoende cellen te verkrijgen is overgegaan op de methode om de organismen door een 100 µ gaasje te wrijven. Dit is geprobeerd met 8 L3-L4 larven en met 20-25 L1-L2 larven.

2.4.4 Controle vitaliteit cellen

Benodigdheden: Telkamer volgens Bürker, trypaanblauwoplossing 0,4%, het medium waarin de cellen zitten en de celsuspensie zelf.

In een eppendorf cupje wordt 10 µl trypaanblauwoplossing gepipetteerd en 80 µl buffer waarin de cellen zitten (zonder de cellen). Hieraan wordt 10 µl celsuspensie toegevoegd en het geheel wordt goed gemengd. Uit deze oplossing wordt 10 µl gehaald en in de telkamer gepipetteerd. Nu wordt onder een microscoop in 25 grote vakken de cellen geteld. De levende cellen zijn ongekleurd, de dode blauw. De celconcentratie in de oorspronkelijke suspensie is dan (totaal getelde cellen in de 25 vakken) * 10⁴ * 10 = aantal cellen per ml. De vitaliteit van de suspensie in procenten is: (aantal levende cellen)/(totaal aantal cellen)*100.

2.5 De Cometassay

Met de celsuspensies kan nu verder worden gewerkt.

Het gebruikte protocol is een aangepaste versie van de door van Devaux *et al* in 1997 beschreven methode. Er werden objectglasjes met matranden gebruikt. Op de matrand werd 45 µl warme 0.8 % normal melting point agarose (Sigma A-0169) in de buffer waar ook de cellen in zijn gesuspenseert gepipetteerd. De normal meltingpoint agarose werd gemaakt door 0.8 % agarose toe te voegen aan de buffer waar ook de celsuspensie mee wordt gemaakt. De oplossing werd bedekt met 18 x 18 mm dekglasjes. Alle glasjes werden voor ongeveer 20 min bij 4 °C gezet. Hierna werden de dekglasjes van de agarose gehaald en gebruikt om de normal meltingpoint agarose van het matte gedeelte van de objectglasjes af te halen. De resten agarose die achter blijven dienen als hecht laag voor de volgende agarose laag. Ondertussen worden nieuwe dekglasjes licht ingevet met vaseline. Hierna werd van elke celsuspensie 50 µl gepipetteerd in 50 µl 1% low gelling point agarose (LMP agarose, Sigma A-4018) die op 37 °C was gebracht. Hiervan werd 40 µl gepipetteerd op een matrand van een voorbehandeld objectglasje. Dit gebeurde in duplo. De agarose met de celsuspensie werd afgedekt met een dekglasje met vaseline en 10 min bij 4 °C gezet. Na het voorzichtig verwijderen van de dekglasjes werd op de vorige laag een nieuwe laag agarose gepipetteerd die bestaat uit een mengsel van 10 µl LMP agarose en 10 µl gekoelde celbuffer met 0.1 % BSA. Na het geheel weer te hebben afgedekt met de ingevette dekglasjes, werden de objectglasjes weer voor 10 min bij 4 °C gezet.

Hierna werden de dekglasjes voorzichtig verwijderd. De objectglasjes werden een uur in een lysebuffer (voor samenstelling zie bijlage) geplaatst bij 4 °C in het donker. De glasjes werden hierna 1 keer voorzichtig gespoeld met demi water en overgebracht naar een horizontale electroforesebak (Hoeffler supersub).

Hierin werd koude electroforesebuffer (zie bijlage voor samenstelling) gegoten totdat de glasjes ongeveer 2 tot 3 mm ondergedompeld waren. Hierbij werden de objectglasjes met de matte kant in de richting van de pluspool gelegd. In het donker werd nog 30 min geïncubeerd om het DNA in de celkern te laten ontwikkelen. Hierna werd er gedurende 24 minuten bij 20 Volt en ongeveer 300 mA geëlectroforeerd. Tijdens de electroforese werd er niet gekoeld. Na de electroforese werden de glasjes overgebracht naar een kleurbak waar ze werden bedekt met een neutralisatie buffer (0.4 M Tris/HCl pH 7.5) gedurende 10 minuten. Hierna werden de preparaten 1 keer in demiwater gespoeld. Nu werd 200 µl ethidiumbromide oplossing (Sigma E-1385, 20 µg/ml) per glasje opgebracht. Na 10 minuten kleuren en 5 minuten spoelen in demiwater werden de glasjes afgedekt en bekeken onder een Olympus BH-2 microscoop met epi-illuminatie van een HBO-100 kwiklamp met een excitatiefilter van 515-560 nm en een sperfilter van 590 nm. Van de eerste 50 cellen die tegen werden gekomen in een preparaat werd met behulp van een geavanceerd beeld analyse systeem (comet Assay II systeem van Perceptive Instruments) een reeks van gegevens verzameld waarvan de staartlengte en de tailmoment de belangrijkste waren. De tailmoment is de staart intensiteit vermenigvuldigd met de oppervlakte van de staart. De waarnemingen werden met elkaar vergeleken met de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties en de Williams test.

2.5.1 Neutraal rood retentie test

In verband met tijdgebrek en in de discussie besproken nadelen van de NRR test zijn de testen met de NRR methode beperkt gebleven tot 1 acute blootstellings test bij *Daphnia*'s en het kijken naar de eventuele aanwezigheid van kleurbare lysosomen bij cellen uit de kieuwbogen van de driehoeksmossel.

Voor de in vivo blootstelling aan de test stoffen werden *Daphnia*'s gebruikt die minimaal één week oud zijn. De darmen van jongere dieren zijn moeilijk te beoordelen. De epitheelcellen van *Daphnia*'s zijn holocrien, dat wil zeggen dat ze de producten die ze uitscheiden (in dit geval spijsverteringsenzymen) niet exocyteren maar dat het celmembraan aan de darmholte zijde openbreekt waarna de celinhoud met de producten vrijkomen (Schultz 1976). Dit blijkt bij jonge *Daphnia*'s zo vaak te gebeuren dat de hele darm er microscopisch rommelig uitziet en moeilijk is te beoordelen of alleen de lysosomen in de cellen aangekleurd zijn of ook het cytoplasma. Nadat de dieren voor de eerste keer jongen hebben gehad is de opbouw van het epitheel regelmatig en daardoor beter te beoordelen in de neutraal rood retentie test. Bij de acute blootstelling werden de *daphnia*'s 48 uur blootgesteld aan de teststoffen in Elendt M4. Tijdens deze blootstelling worden de dieren niet gevoerd. Na de blootstelling werden de dieren gespoeld in *Daphnia* Buffer met BSA (zie bijlage) en overgebracht naar een objectglasje. Vervolgens werden de darmen uitgerepareerd. De darmen werden overgebracht naar objectglasjes met 30 µl DBSA, één darm per glasje. Vervolgens werden ze voorzichtig met 2 prepareren naalden uit elkaar getrokken tot er 5 tot 8 stukken waren. Hierna werd 30 µl van een oplossing met 200 µg/ml neutraal rood (Sigma N-6634) en 0.5 mg/ml trypsin inhibitor (Sigma T-6522) in DBSA per glasje toegevoegd en gemengd. Het moment van toevoegen van de neutraal rood oplossing werd geregistreerd en aangehouden als T_0 . De glasjes werden afgedekt met 21 x 26 mm dekglasjes en in een incubatie bak in een vochtige atmosfeer bij kamertemperatuur gehouden. Iedere 15 minuten werden de darmfragmenten bekeken. Op het moment dat in meer dan 80% van de cellen neutraal rood uit de lysosomen in het cytosol lekte (zichtbaar door het paarsrood aankleuren van het cytoplasma) werd de tijd geregistreerd. De tijd tussen T_0 en dit moment wordt de retentietijd genoemd. Per preparaat werden 3 darmfragmenten bekeken. De gemiddelde retentietijden per preparaat en per concentratie werden vergeleken en op significante verschillen getoetst met de William's test (Williams, 1971). Bij de test proef die is uitgevoerd is blootgesteld aan Cd bij de volgende concentraties: 0, 100, 180 µg Cd/l.

De preparaten bleken onder de test moeilijk uit te lezen. Er is daarom besloten om de resultaten niet te plaatsten.

2.5.2 DNA reparatie experiment met de *Daphnia magna* (Watervlo)

Het doel van dit experiment was het kijken naar de effecten van een herstel periode van 2 dagen na blootstelling aan verschillende concentraties 4-NQO op de waargenomen hoeveelheid DNA strengbreuken bij *Daphnia magna*. Hiervoor werden per concentratie 40 *Daphnia*'s ingezet die jonger waren dan 24 uur. Na 48 uur blootstelling werden 20 *Daphnia*'s per concentratie uitgehaald en werd er naar DNA schade gekeken met de cometassay methode. De overgebleven *Daphnia*'s werden

overgebracht naar schoon Elendt M4 (voor samenstelling zie bijlage). Na 48 uur onder ongecontamineerde omstandigheden werden ook de overgebleven Daphnia's bekeken op DNA schade. De Daphnia's werden blootgesteld in glazen potten met een inhoud van 750 ml. De 4-NQO werd opgelost in 300 ml Elendt M4. De blootstelling vond plaats bij de volgende concentraties: 0, 21, 46, 100, 210 µg 4-NQO /l. Onder de blootstelling werden de Daphnia's niet gevoerd. De opstelling werd gehouden in een klimaatkamer die op 20 °C werd gehouden en een dag nacht ritme had van 12 uur licht en 12 uur donker.

2.5.3 Toxiciteit proef met de *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

Om meer inzicht te krijgen in de toxiciteit van de gebruikte toxische stoffen bij de cometassay's op hele driehoeksmosselen, zijn er 2 bioassays uitgevoerd met de driehoeksmossel. Bij deze bioassays zijn levende intacte mosselen maximaal 5 dagen blootgesteld aan de stoffen 4-NQO en EMS. Bij deze proef werden driehoeksmosselen gehouden in glazen potten met een inhoud van 1,5 liter. De driehoeksmosselen werden aan de volgende concentraties toxicanten blootgesteld: EMS: 0, 100, 320, 1000, 3200 mg/l en 4-NQO: 0, 100, 320, 1000, 3200 µg/l

Negen mosselen werden per concentratie in duplo ingezet. De proefopstelling werd constant belucht. De blootstelling was bij 20 °C met een dag/nacht ritme van 12 uur licht en 12 uur donker. Vanaf de derde dag tot het einde van het experiment na 5 dagen is elke dag de overleving gescoord. Een mossel werd dood verklaard als de schelp openstond en deze niet werd dichtgetrokken na het toedienen van een prikkel. Deze prikkel bestond uit het prikken met een prepareernaald tussen de openstaande schelp helften.

2.4.9 De aanwezigheid van lysosomen in cellen van *Dreissena polymorpha*

Om te kijken of de kieuwcellen van de Driehoeksmossel kleurbare lysosomen bezitten is een neutraal rood kleuring uitgevoerd. Hierbij werd 30 µl van de celsuspensie met 200 µg/ml neutraal rood (Sigma N-6634) gemengd. Hiervan werd 10 µl overgebracht naar een Bürker Telkamer. Met een microscoop werd de kleuring bekeken.

2.5 Statistiek

Voor de statistiek zijn de volgende testen gebruikt: de Williams test voor oplopende effecten en de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties.

De Williams test gaat uit van een hogere respons bij een hogere dosis. De controle waarden moeten normaal verdeeld zijn. (Williams 1971)

Omdat blijkt dat niet alle reacties een hogere respons geven dan de lagere concentraties, en niet alle controle bepalingen normaal verdeeld waren, is besloten om de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties uit te voeren. Deze test gaat niet uit van een normale verdeling of van een oplopende respons bij een hogere dosis. Alle waarden worden met elkaar vergeleken. De Kruskal-Wallis test is hierdoor wel minder gevoelig.

3 Resultaten

3.1 Cometassay met *Daphnia magna* (Watervlo)

Deze eerste cometassay experimenten werden uitgevoerd om bekend te raken met de methode. Sommige concentraties vielen weg door het verliezen van de agarose laag van objectglasjes tijdens de lysis procedure. Deze testen zijn nog met de hand uitgelezen, met behulp van een micrometer op de fluorescentie microscoop. De staartlengte is gemeten vanaf het einde van de DNA kern tot het einde van de staart. De resultaten zijn te zien in figuur 3.1 en 3.2.

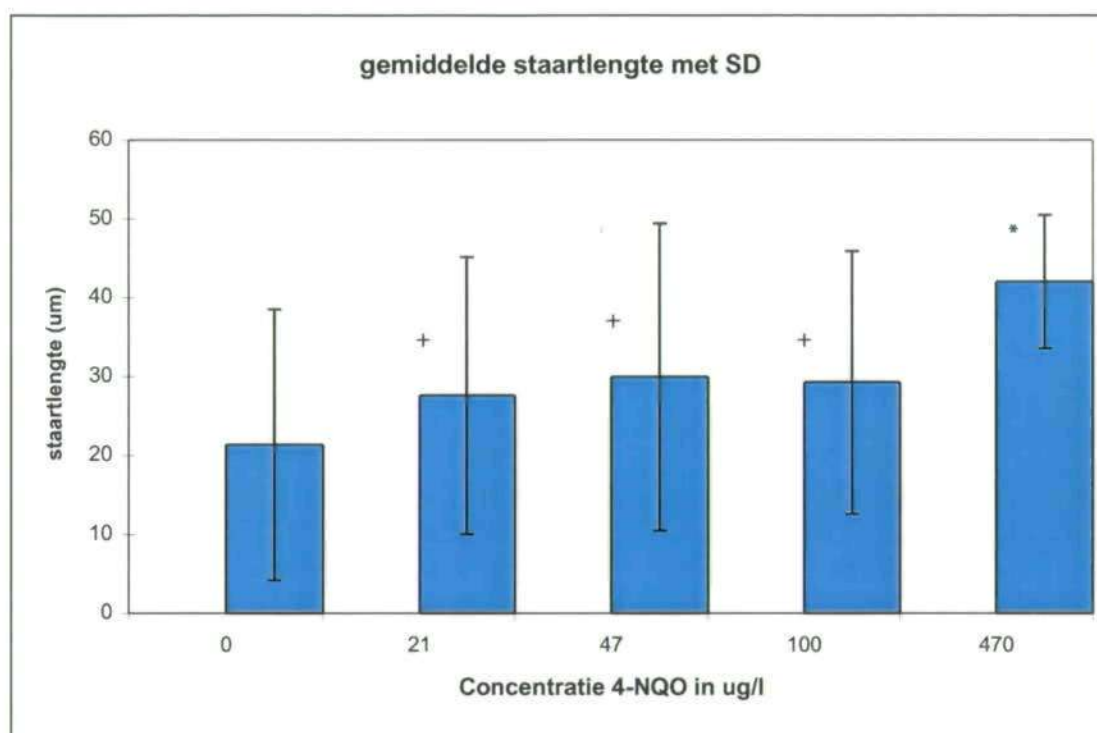


Fig 3.1: Cometassay met de *Daphnia Magna* na een in vivo blootstelling van 48 uur aan de mutagene stof 4-NQO. Gemeten is de lengte van de staart met gemigreerde DNA fragmenten. De metingen zijn gedaan met een micrometer op een fluorescentie microscoop. Er is gemeten vanaf het einde van de celkern tot het einde van de staart. (*) is significant afwijkend volgens de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties en volgens de Willams test voor gegevens die normaal verdeeld zijn. (+) is significant afwijkend volgens de William's test. De controle is normaal verdeeld. N=50.

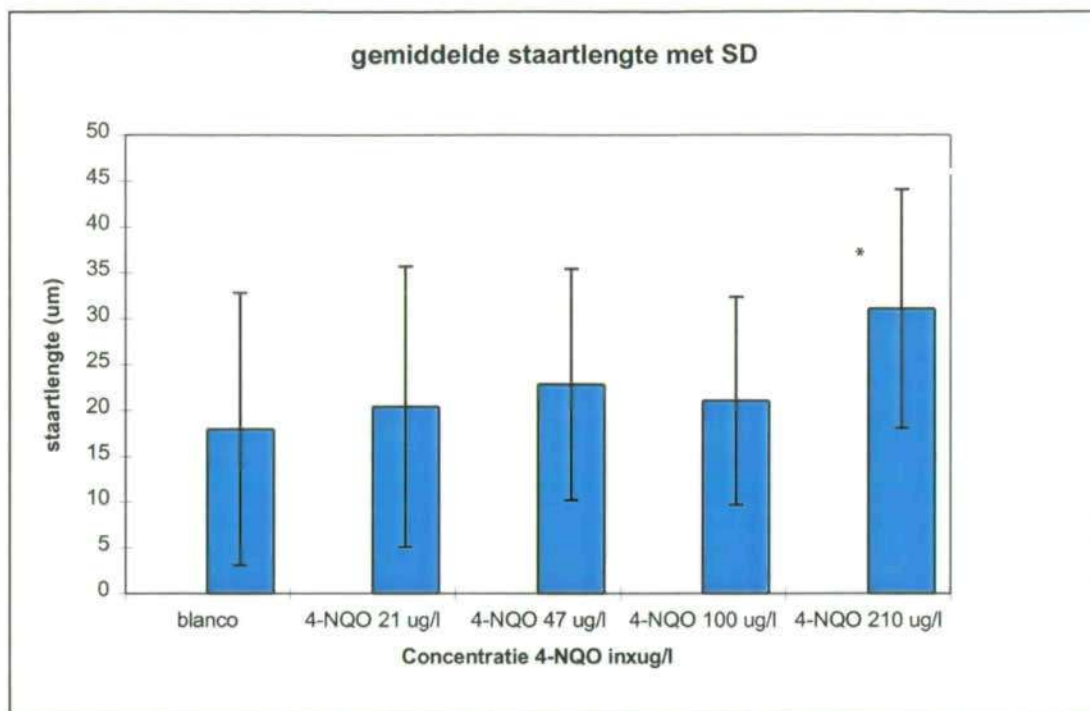


Fig 3.2: Cometassay met de *Daphnia Magna* na een in vivo blootstelling van 48 uur aan de mutagene stof 4-NQO. Gemeten is de lengte van de staart met gemigreerde DNA fragmenten. De metingen zijn gedaan met een micrometer op een fluorescentie microscoop. Er is gemeten vanaf het einde van de celkern tot het einde van de staart. (*) is significant afwijkend volgens de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties en volgens de Willams test voor gegevens die normaal verdeeld zijn. De blanco is normaal verdeeld. N=50.

Wat opvalt in figuur 3.1 is de significante afwijking met de Williams test van de blootstelling aan 21 µg/l 4-NQO ten opzichte van de controle. Dit is het laagste gemeten gehalte dat significant afwijkt van de controle die tot nu toe gemeten is. Bij vergelijkbare concentraties zijn de staartlengten in Figuur 3.2 gemiddeld kleiner dan in figuur 3.1.

3.1.2 DNA reparatie experiment

Door te kijken naar het effect van een herstelfase van twee dagen na een blootstelling van twee dagen aan 4-NQO, wordt inzicht gekregen in de snelheid van DNA reparatie in *Daphnia magna*.

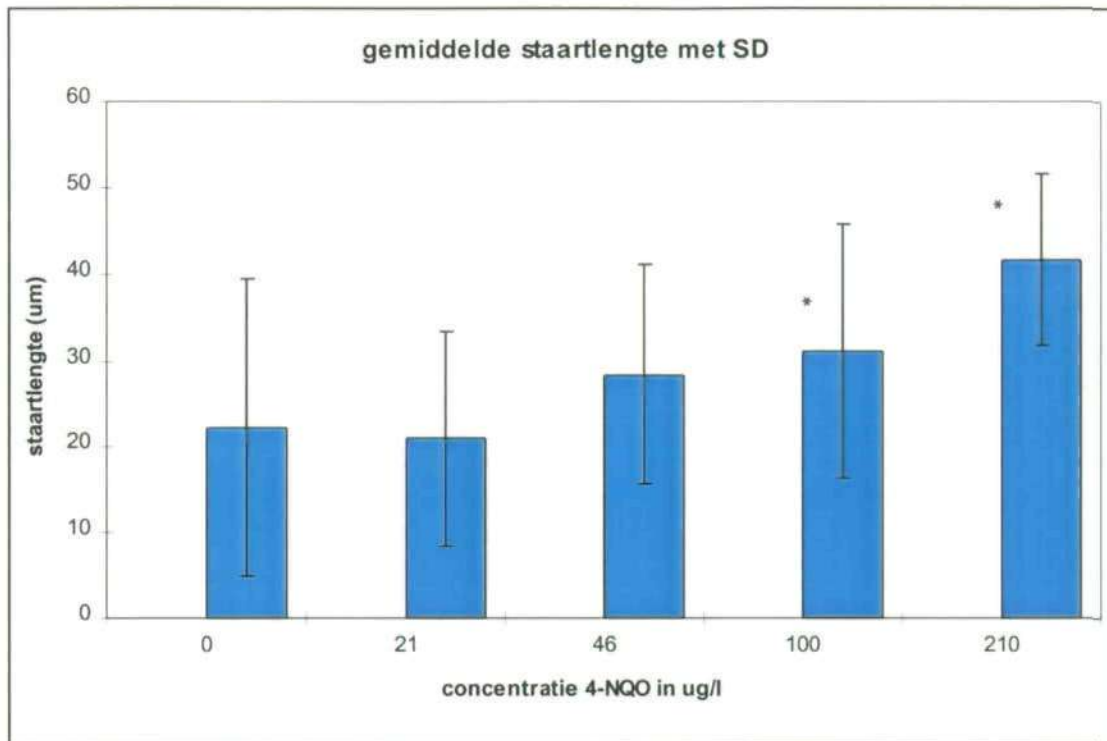


Fig. 3.3: Staartlengte in μm na 2 dagen in vivo blootstelling aan 4-NQO. Gemeten is de lengte van de staart met gemigreerde DNA fragmenten. De metingen zijn gedaan met een micrometer op de fluorescentie microscoop. Er is gemeten vanaf het einde van de celkern tot het einde van de staart. (*) is significant afwijkend volgens de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties. N=50.

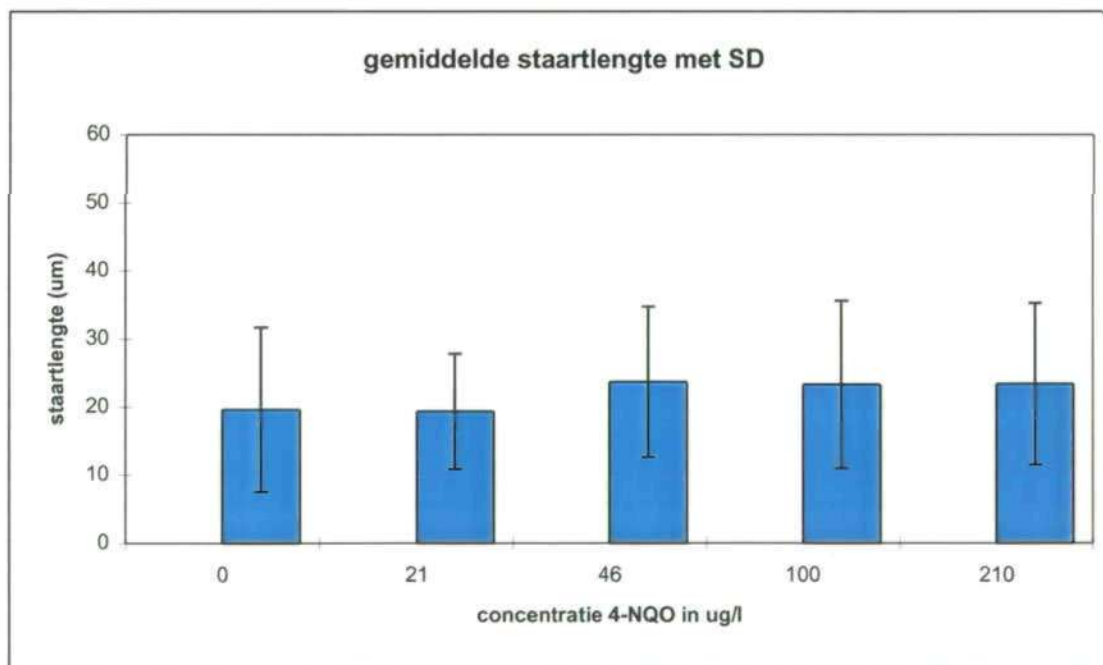


Fig. 3.4: Staartlengte in μm na 2 dagen rust na 2 dagen in vivo te zijn blootgesteld aan 4-NQO. Gemeten is de lengte van de staart met gemigreerde DNA fragmenten. De metingen zijn gedaan met een micrometer op de fluorescentie microscoop. Er is gemeten vanaf het einde van de celkern tot het einde van de staart. Er zijn geen significante verschillen gemeten met de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties. N=50.

De significante verschillen gemeten na twee dagen blootstelling aan 4-NQO bij de concentraties 100 en 210 µg/l zijn na een herstelfase van twee dagen niet meer zichtbaar. De gemiddelde staartlengten zijn na een herstelfase van twee dagen bijna op het niveau van de controle Daphnia's. De gemeten waarden na de blootstelling aan 100 en 210 µg/l wijken significant af van de waarden gemeten na een herstelfase van twee dagen.

3.2 Celvitaliteit metingen aan de celsuspensie van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

Om de juiste osmolariteit van een buffer te vinden waarin de cellen van een driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) een optimale vitaliteit laten zien, zijn de cellen blootgesteld aan een reeks oplossingen met een oplopende osmolariteit. Bij de verschillende osmolariteiten werden enzymdigesties uitgevoerd met collagenase om zo losse cellen te krijgen. Hierna is er naar de vitaliteit en het aantal cellen per ml gekeken.

Tabel 3.1: Cel vitaliteit metingen in aantallen per 25 hokken van de telkamer.

Celvitaliteit							
Gemeten na verkrijgen celsuspensie							
Buffer							
	Osmolariteit	Levend	Dood	Totaal	Vitaliteit	Aantal cellen per ml *10 ⁶	
DSW	8.32 mOsm/L	36	58	94	39%	9,3	
1/4 PBS	80 mOsm/L	21	0	21	100%	2,1	
1/2 PBS	160 mOsm/L	36	4	40	90%	4	
3/4 PBS	240 mOsm/L	73	23	96	76%	9,6	
1 PBS	320 mOsm/L	121	30	151	80%	15,1	
Gemeten een dag na verkrijgen celsuspensie.							
Buffer							
	Osmolariteit	Levend	dood	totaal	vitaliteit	aantal cellen per ml *10 ⁶	
DSW	8.32 mOsm/L	42	29	71	59%	7,1	
1/4 PBS	80 mOsm/L	19	0	19	100%	1,9	
1/2 PBS	160 mOsm/L	37	5	42	88%	4,2	
3/4 PBS	240 mOsm/L	65	12	77	84%	7,7	
1 PBS	320 mOsm/L	101	43	144	70%	14,4	

Wat opvallend is uit tabel 3.1 is dat het aantal cellen in de oplossing negatief gerelateerd is aan de vitaliteit. Bij de osmolariteit waarbij de vitaliteit het hoogst is zijn het minste aantal cellen per milliliter te vinden. De verkregen celsuspensies zijn een paar dagen bewaard bij een temperatuur van 4 °C in het donker. Na 5 dagen waren er nauwelijks veranderingen in de vitaliteit te zien bij de concentraties ¼ PBS en ½ PBS. Uiteindelijk is gekozen voor een concentratie van 1/3 PBS.

3.3 Cometassay met *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

De metingen bij de cometassay bepaling met de mossel *Dreissena polymorpha* zijn uitgevoerd met het image analyse comet Assay II systeem (versie 2.11) van Perceptive Instruments. Dit systeem maakte het mogelijk om ook het tailmoment te bepalen van een komeet. In het programma wordt de staartlengte bepaald vanaf de helft van de DNA kern tot het einde van de staart (zie figuur 3.5). Door deze nieuwe methode zijn de latere metingen aan staart lengte langer.

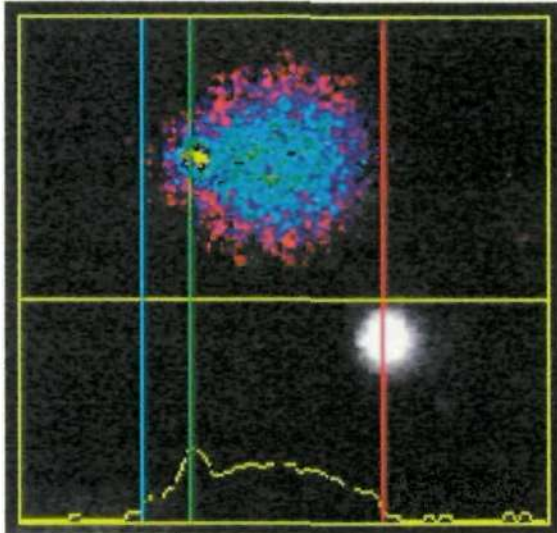


Fig. 3.5: Beeld van het comet Assay II systeem van Perceptive Instruments. De blauwe lijn geeft het begin van de kern weer. De groene lijn is het midden van de kern. De rode lijn is het einde van de DNA staart.

3.3.1 Cometassay na in vivo blootstelling van *Dreissena polymorpha* aan 4-NQO

De eerste in vivo cometassay aan de driehoeksmossel is in duplo ingezet. Een van de preparaten van de mosselen die bij 37.5 µg/l waren blootgesteld is verloren gegaan bij deze cometassay met de driehoeksmossel.

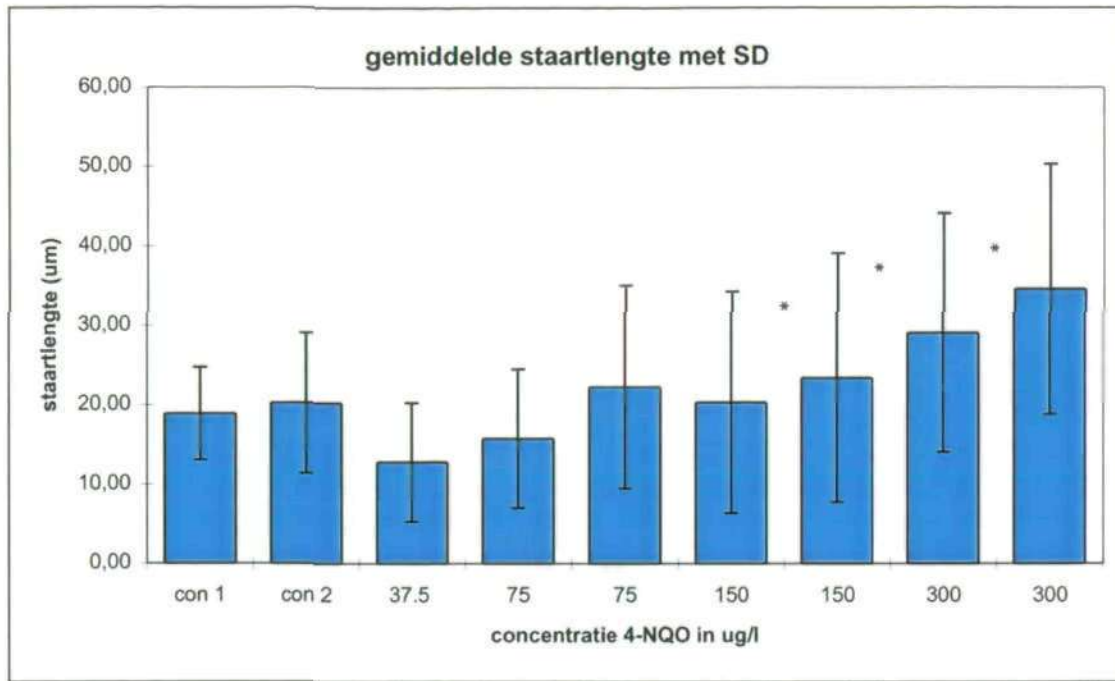


Fig. 3.6: 1^e Cometassay met de driehoeks mossel (*Dreissena polymorpha*) na een in vivo blootstelling aan de mutagene stof 4-NQO voor 48 uur. Gemeten is de lengte van de staart met gemigreerde DNA fragmenten. De metingen zijn gedaan met het comet Assay II systeem van Perceptive Instruments. Er is gemeten vanaf het midden van de celkern tot het einde van de staart. (*) is significant afwijkend volgens de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties. Controle 1 is normaal verdeeld, N=50.

Opvallend zijn de soms redelijk grote verschillen tussen de duplo blootstellingen. Vooral het verschil tussen de twee preparaten die aan 75 µg 4-NQO/l blootgesteld zijn is aanzienlijk. De lage concentraties (37.5 en 75 µg/l) laten gemiddeld een kortere staartlengte zien dan de 2 controle preparaten.

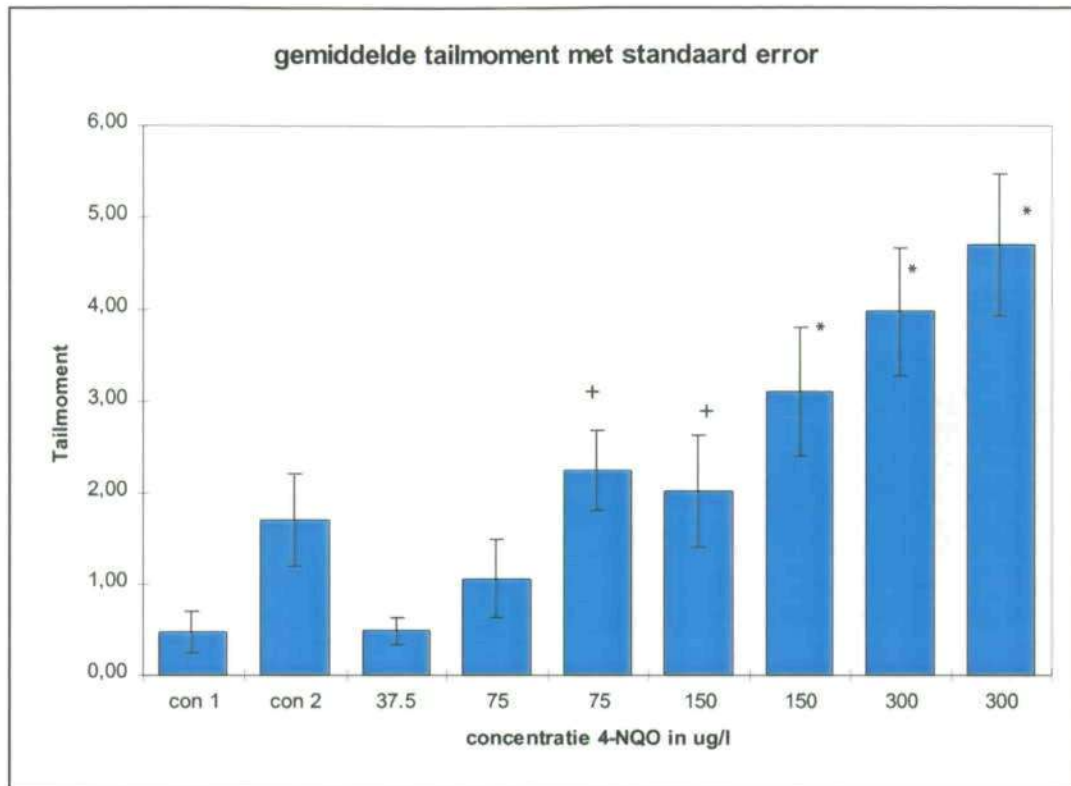


Fig. 3.7: 1^e Cometassay met de driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) na een in vivo blootstelling aan de mutagene stof 4-NQO voor 48 uur. Gemeten is het tailmoment (staartlengte maal staartintensiteit). De metingen zijn gedaan met het comet Assay II systeem van Perceptive Instruments. (*) is significant afwijkend volgens de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties en de william's test ten opzichte van de controle. (+) is significant afwijkend volgens de William's test ten opzichte van de eerste controle. Controle 1 is niet normaal verdeeld. De verdeling in controle 1 laat 2 toppen zien. N=50.

Als er naar het tailmoment wordt gekeken blijkt er een duidelijkere dosis-effect relatie waarneembaar dan bij dezelfde preparaten bij de staartlengte (figuur 3.6). Wat verder opvalt is het grote verschil tussen controle 1 (con 1) en controle 2 (con 2). In controle 2 zijn veel brede kometen waargenomen zoals in figuur 3.8 weergegeven.



Fig 3.8: Brede kometen zoals frequent waargenomen in controle 2.

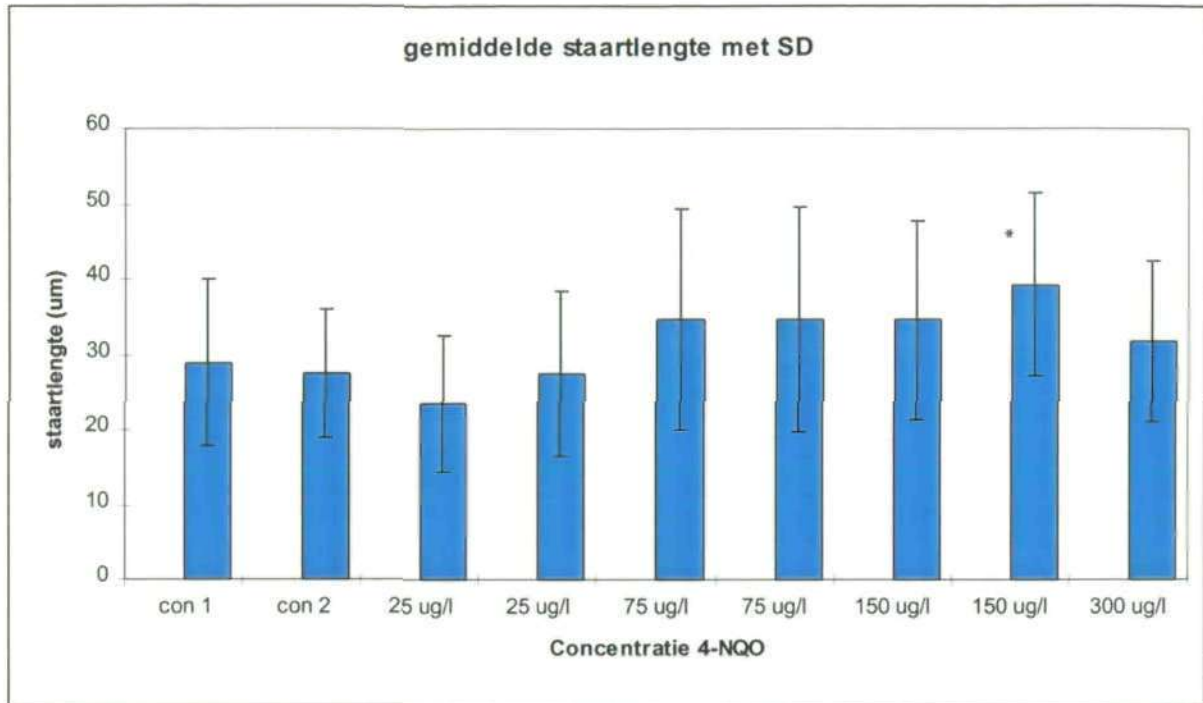


Fig. 3.9: 2^e Cometassay met de driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) na een in vivo blootstelling aan de mutagene stof 4-NQO voor 48 uur. Gemeten is de lengte van de staart met gemiddelde DNA fragmenten. De metingen zijn gedaan met het comet Assay II systeem van Perceptive Instruments. Er is gemeten vanaf het midden van de celkern tot het einde van de staart. (*) is significant afwijkend volgens de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische. Controle 1 (con 1) is niet normaal verdeeld. N=50.

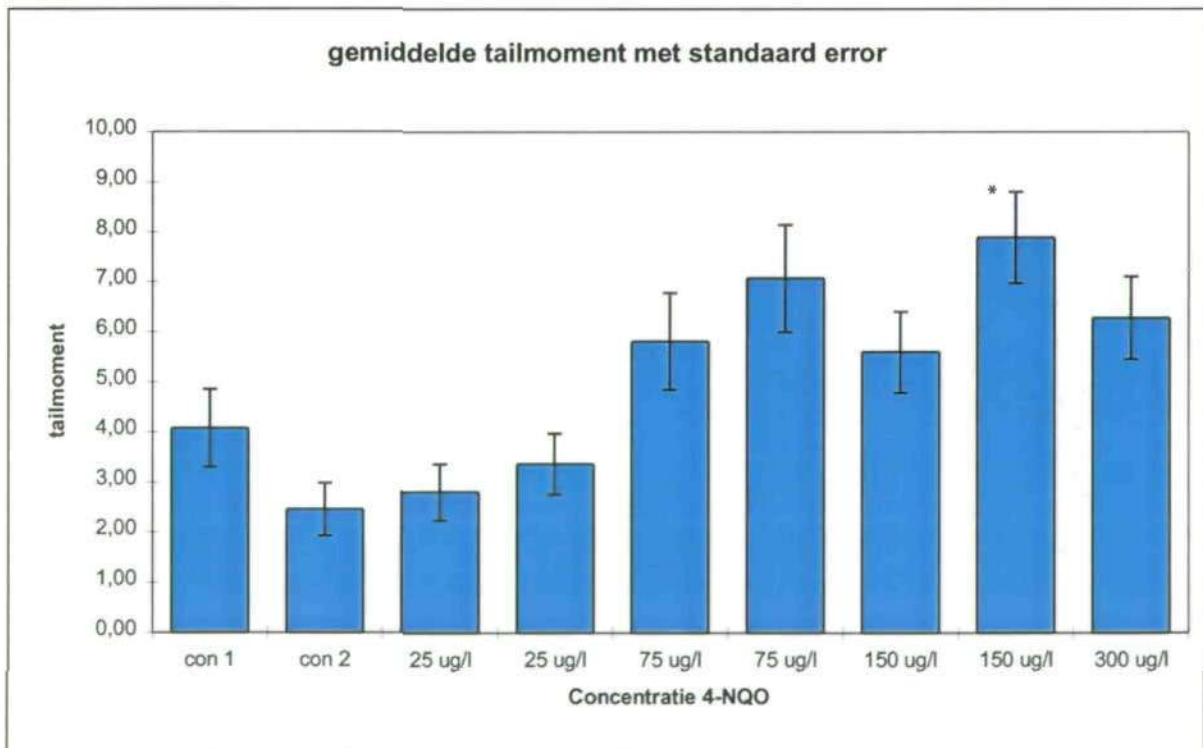


Fig. 3.10: 2^e Cometassay met de driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) na een in vivo blootstelling aan de mutagene stof 4-NQO voor 48 uur. Gemeten is het tailmoment. De metingen zijn gedaan met het comet Assay II systeem van Perceptive Instruments. (*) is significant afwijkend volgens de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties. N=50.

Bij het uitvoeren van de 2^{de} cometassay is 1 duplo preparaat verloren gegaan van de concentratie 300 µg/l.

Opvallend aan figuur 3.9 en figuur 3.10 is de lagere respons bij blootstelling aan 25 µg/l ten opzichte van de controle. De respons bij de blootstelling aan 300 µg/l is lager dan die van een concentratie lager. In figuur 3.7 is te zien dat de verschillen tussen de duplo's aanzienlijk kunnen zijn.

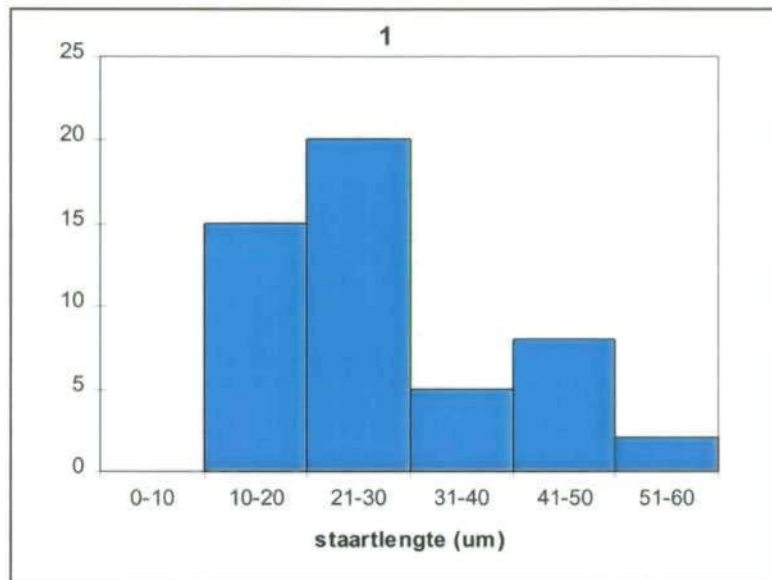


Fig. 3.11: Verdeling van controle 1 uit fig 3.9, ingedeeld naar staartlengte.

Controle 1 (con 1, fig 3.9) was niet normaal verdeeld volgens de Chi- kwadraat test voor normaal verdeeldheid. De verdeling laat een tweede piek zien.

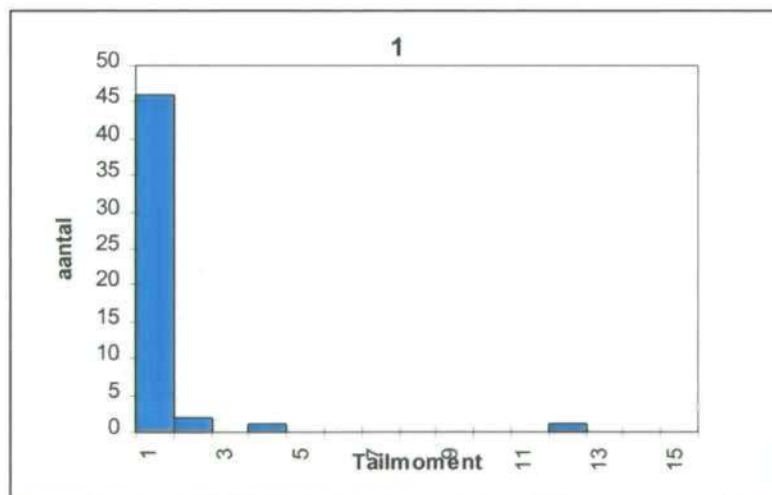


Fig. 3.12: Verdeling van controle 1 uit fig 3.10, ingedeeld naar tailmoment

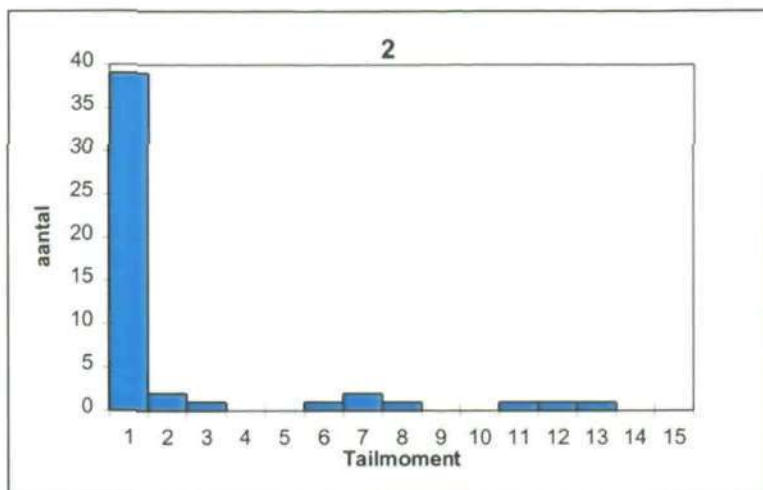
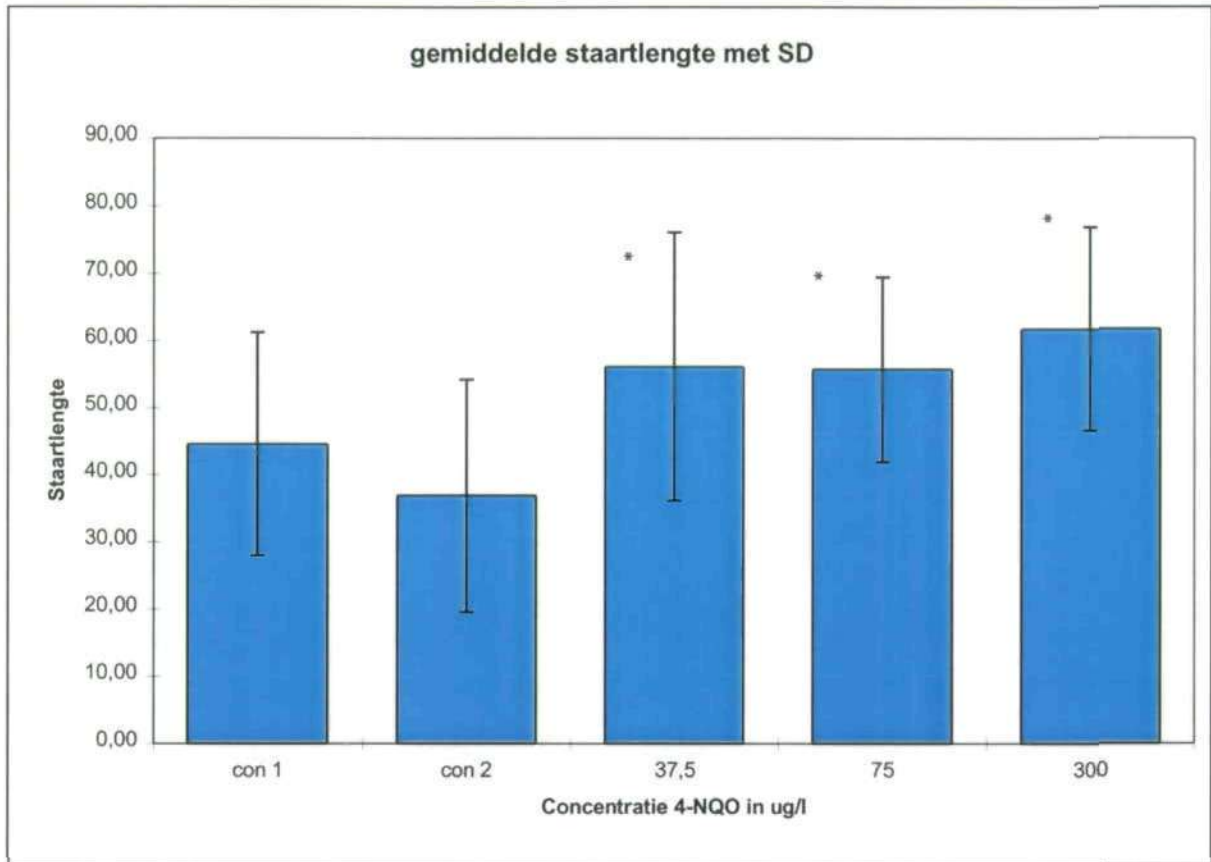


Fig. 3.13: Verdeling van controle 2 uit fig 3.10, ingedeeld naar tailmoment

De verdelingen van het tailmoment van controle 1 en 2 laten beide meer dan 1 piek zien. In controle 2 (figuur 3.13) zijn drie verschillende groepen te zien.

3.3.2 Cometassay na in vitro blootstelling van *Dreissena polymorpha* aan 4-NQO

De in vitro blootstellingen zijn gedaan op cellen die al in de agarose op een object glaasje zaten. Deze werden 2 uur blootgesteld aan verschillende concentraties 4-NQO.



3.14: Cometassay met de Driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) na een in vitro blootstelling aan de mutagene stof 4-NQO voor 2 uur. Gemeten is de lengte van de staart met gemigreerde DNA fragmenten. De metingen zijn gedaan met het comet Assay II systeem van Perceptive Instruments. Er is gemeten vanaf het midden van de celkern tot het einde van de staart. (*) is significant afwijkend volgens de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties en de William's test. N=50.

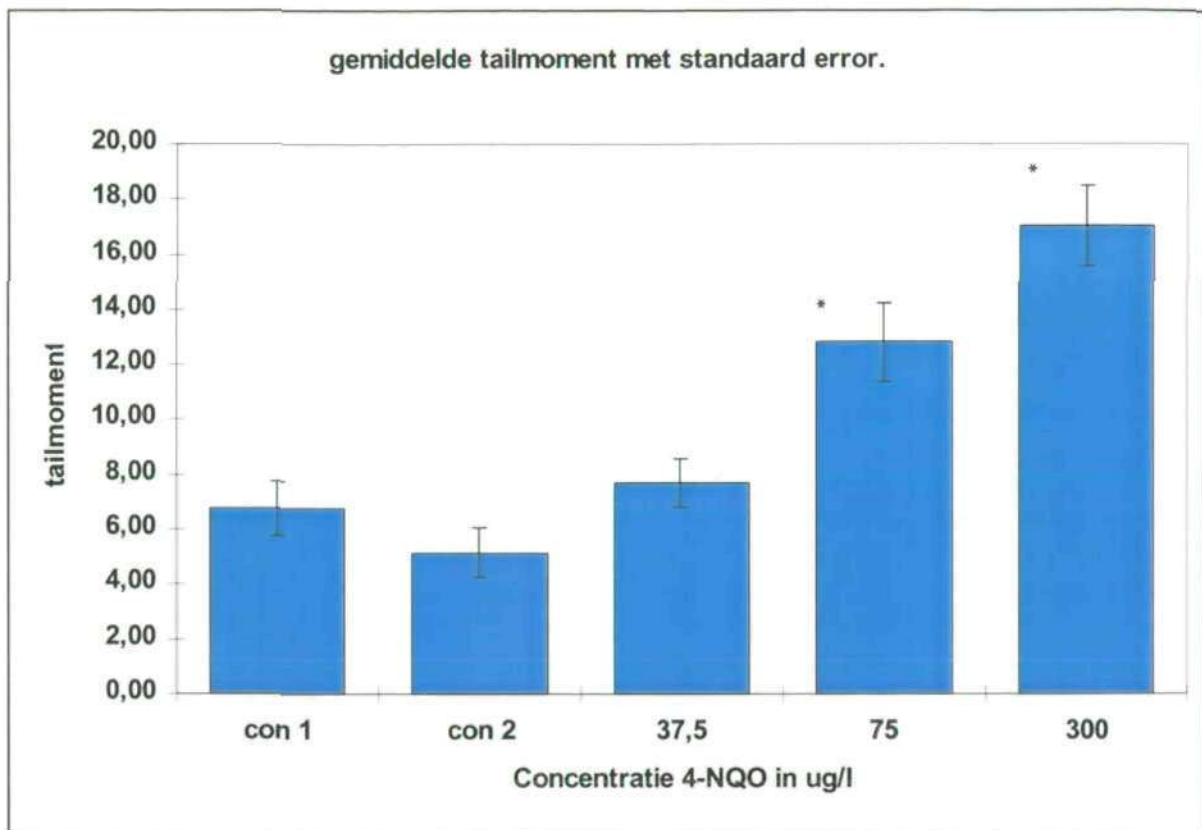


Fig. 3.15: Cometassay met de Driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) na een in vitro blootstelling aan de mutagene stof 4-NQO voor 2 uur. Gemeten is het tailmoment. De metingen zijn gedaan met het comet Assay II systeem van Perceptive Instruments. (*) is significant afwijkend volgens de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties en de William's test. N=50.

Wat onder andere opvalt aan de gegevens zijn de staartlengtes bij de controle preparaten. Deze liggen duidelijk hoger dan bij de in vivo blootstellingen. Controle 1 (con 1) laat bij zowel de staartlengte als tailmoment een hogere respons zien dan controle 2 (con 2). De verlaging van respons bij de lage concentraties zoals bij de in vivo blootstelling waargenomen, is hier afwezig. De tailmoment laat een mooiere dosis effect relatie zien dan de staartlengte.

3.3.3 cometassay na in vivo blootstelling van *Dreissena polymorpha* aan EMS

De cometassay met de stof EMS was in duplo ingezet maar tijdens de procedure zijn er enkele duplo's verloren gegaan.

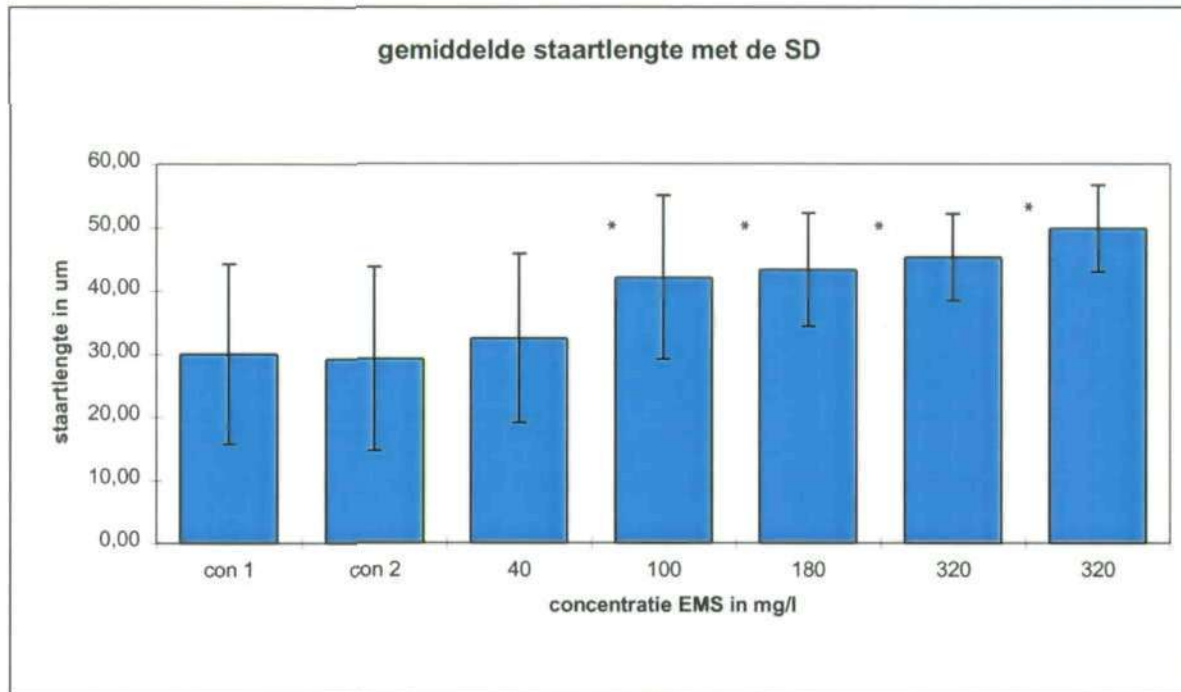


Fig. 3.16: Cometassay met de Driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) na een in vivo blootstelling aan de mutagene stof EMS voor 48 uur. Gemeten is de lengte van de staart. De metingen zijn gedaan met het comet Assay II systeem van Perceptive Instruments. Er is gemeten vanaf het midden van de celkern tot het einde van de staart. (*) is significant afwijkend volgens de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties en de William's test. N=50.

In fig 3.16 is te zien dat de gemiddelde staartlengtes toenemen met een hogere concentratie. De verlaging van de respons bij lage concentraties, zoals waargenomen bij de in vivo blootstelling aan 4-NQO, is hier niet zichtbaar.

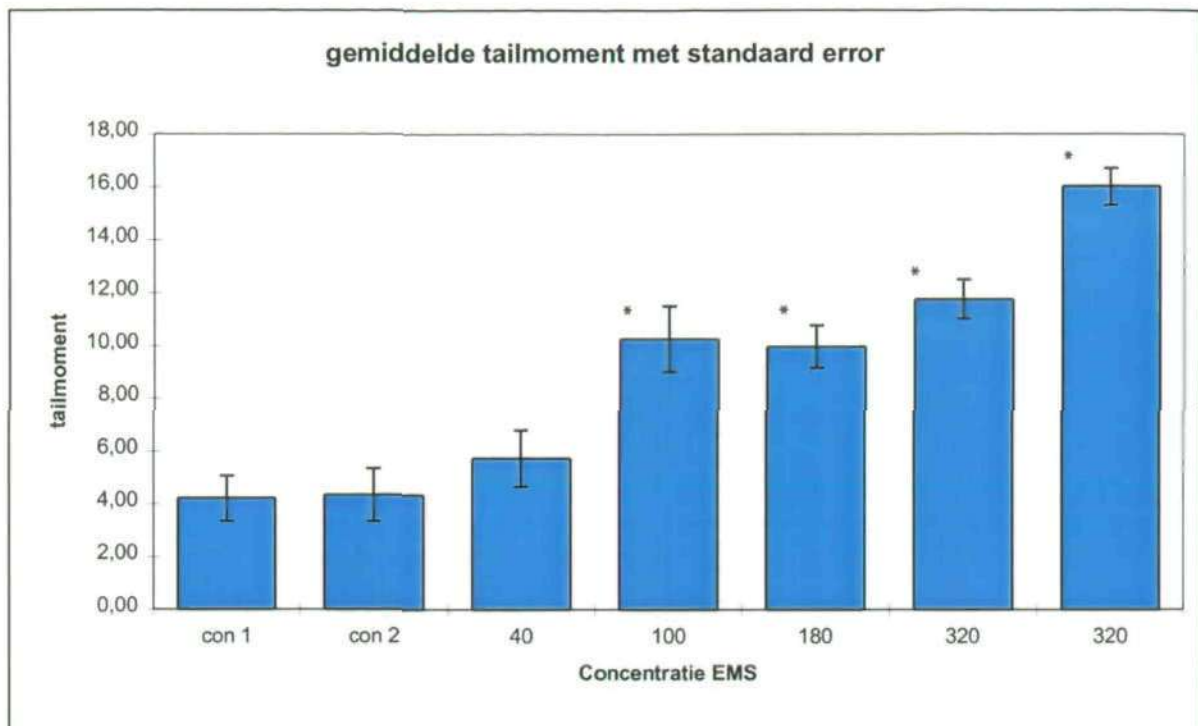


Fig. 3.17: Cometassay met de Driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) na een in vivo blootstelling aan de mutagene stof EMS van 48 uur. Gemeten is het tailmoment (staartlengte maal staartintensiteit). De metingen zijn gedaan met het comet Assay II systeem van Perceptive Instruments. (*) is significant afwijkend volgens de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties en de William's test. N=50.

Wat opvalt in fig. 3.17 is de redelijke dosis effect relatie. Ook opvallend is het grote verschil tussen de gemiddelde tailmomenten bij blootstelling aan 320 mg/l.

3.4 Vergelijking tussen alle controles van in vivo experimenten uitgevoerd met *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

Om te kijken naar de spreiding tussen de uitslagen van de controle preparaten bij de testen zijn alle controles van in vivo blootstelling proeven met de driehoeksmossel met elkaar vergeleken.

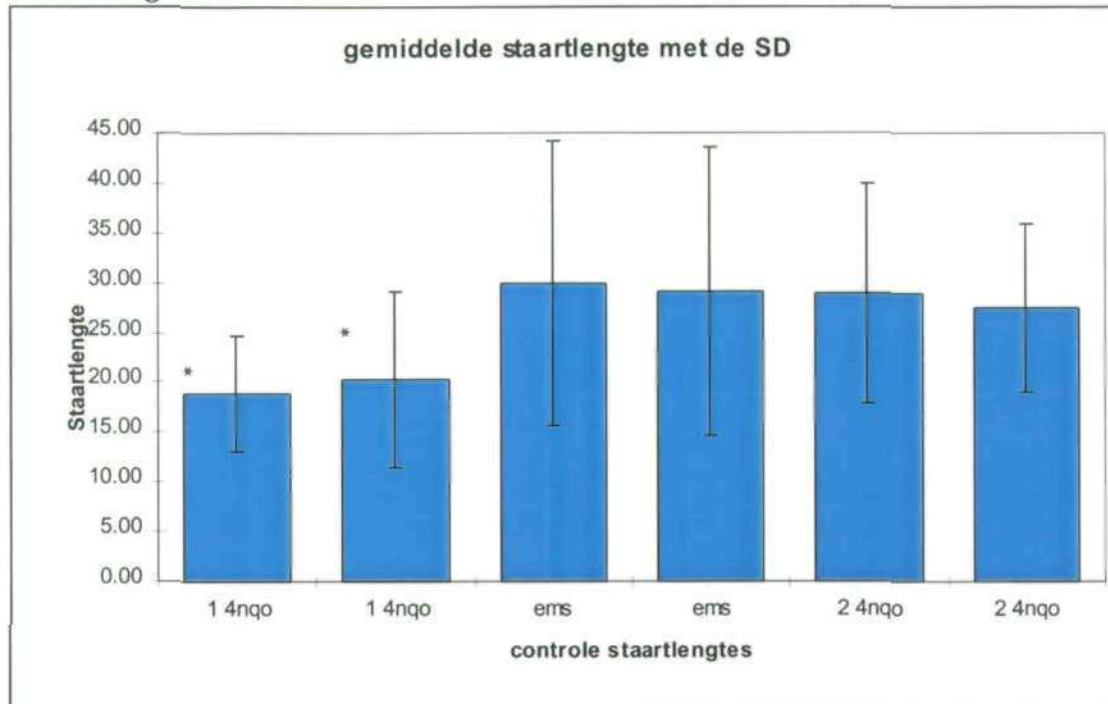


Fig. 3.18: Vergelijking tussen alle controles van in vivo experimenten uitgevoerd met de Driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) waarbij gekeken wordt naar staartlengte. (*) = significant afwijkend van alle andere controles van de groepen EMS en 2 4NQO volgens de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties. N=50.

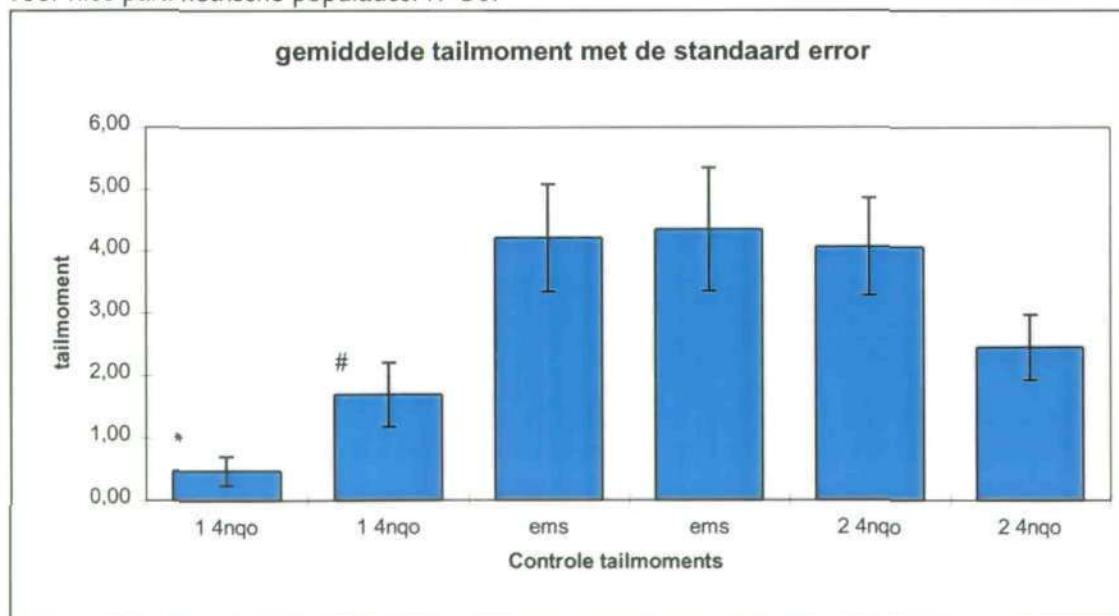


Fig 3.19: vergelijking tussen alle controles van in vivo experimenten uitgevoerd met de Driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) waarbij gekeken wordt naar het tailmoment. (*) = significant afwijkend van alle andere controles van de groepen ems en 2 4NQO, (#)= significant afwijkend van de eerste EMS en de eerste 2 4NQO met de Kruskal-Wallis test voor niet-parametrische populaties.

Wat blijkt uit figuur 3.18 en 3.19 is het duidelijke verschil in gemiddelde staartlengte en tailmoment tussen de 1^{ste} cometassay bij blootstelling aan 4-NQO (uit fig 3.6 en 3.7) en de andere cometassay testen met de driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*). Dit komt door veranderingen van instellingen in het cometassay beeld systeem.

3.5 Toxiciteits proef met *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

Om meer inzicht te krijgen in de toxiciteit van de gebruikte stoffen zijn er 2 bioassays uitgevoerd met de driehoeksmossel. Bij deze bioassays zijn intacte mosselen maximaal 5 dagen blootgesteld aan de stoffen 4-NQO en EMS.

Tabel 3.2: toxiciteitsproef met de Driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*). Bij deze bioassays zijn intacte mosselen maximaal 5 dagen blootgesteld aan verschillende concentraties 4-NQO of EMS.

Toxiciteitproef met de driehoeks mossel						
4-NQO						
concentraties	overleden per dag			totaal	overleving	
	dag 3	dag 4	dag 5			
0 ug/l	0	0	0	0	9	
0 ug/l	0	0	0	0	9	
100 ug/l	0	0	0	0	9	
100 ug/l	0	0	0	0	9	
320 ug/l	0	3	2	5	4	
320 ug/l	1	1	3	5	4	
1000 ug/l	0	4	3	7	2	
1000 ug/l	0	5	4	9	0	
3200 ug/l	1	1	6	8	1	
3200 ug/l	1	2	5	8	1	
LC50 na aantal dagen	16348 ug/l	2189 ug/l	461 ug/l			
EMS						
concentraties	overleden per dag			totaal	overleving	
	dag 3	dag 4	dag 5			
0 mg/l	0	0	0	0	9	
0 mg/l	0	0	0	0	9	
100 mg/l	0	0	0	0	9	
100 mg/l	0	0	0	0	9	
320 mg/l	0	0	0	0	9	
320 mg/l	0	0	0	0	9	
1000 mg/l	0	7	2	9	0	
1000 mg/l	0	7	1	8	1	
3200 mg/l	9	0	0	9	0	
3200 mg/l	9	0	0	9	0	
LC50 na aantal dagen	1788 mg/l	937 mg/l	898 mg/l			

De LC50 na een blootstelling aan 4-NQO voor drie dagen is erg hoog. Dit getal is echter weinig zeggend omdat er te weinig driehoeksmosselen doodgegaan zijn om een LC50 uit te rekenen die betrouwbaar is. De 95 % betrouwbaarheid interval loopt bij deze LC50 van 2232 ug/l tot 119721 ug/l.

Tijdens de proef bleek dat de grote mosselen over het algemeen het eerste dood gingen.

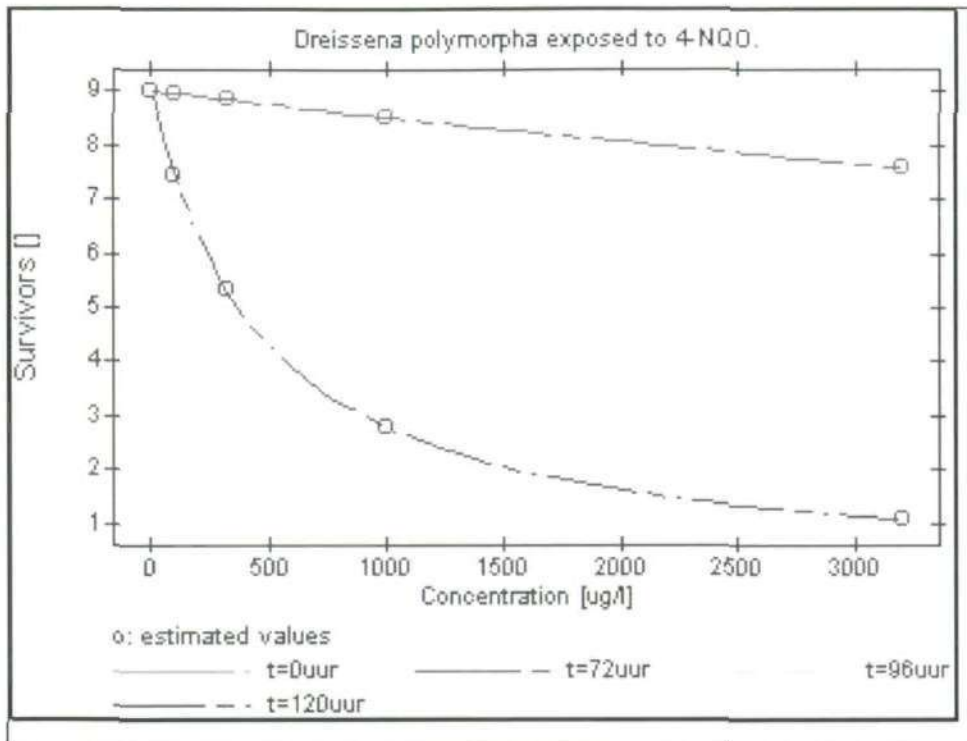


Fig 3.20: Toxiciteitproef met de driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) bij blootstelling aan 4-NQO. Overleving per dag per concentratie. Proef is in duplo ingezet.

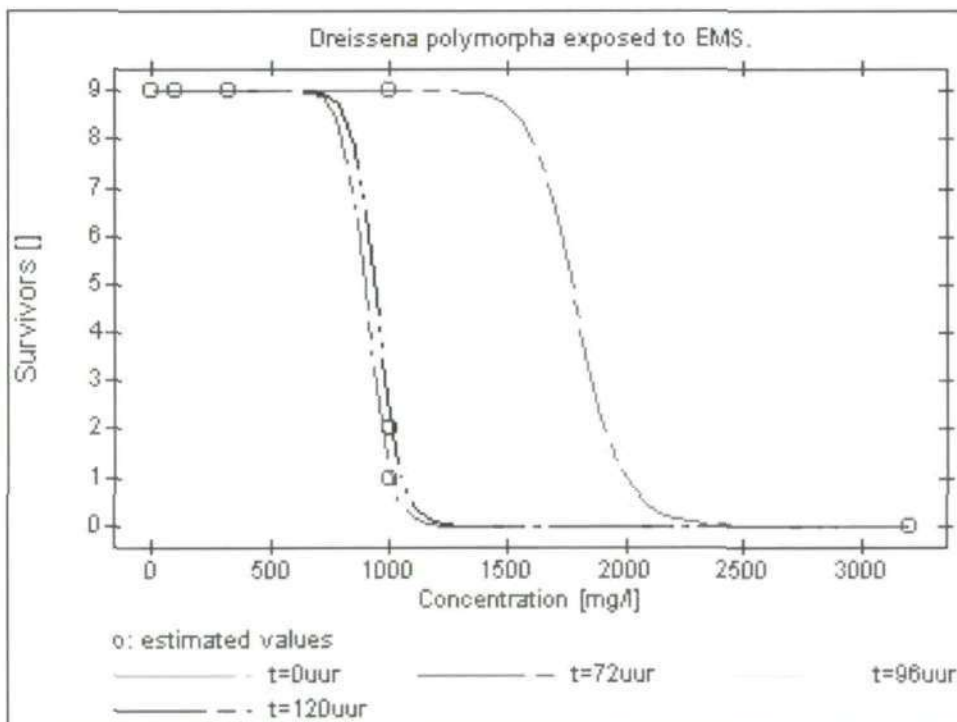


Fig 3.21: Toxiciteitproef met de driehoeksmossel (*Dreissena polymorpha*) bij blootstelling aan EMS. Overleving per dag per concentratie. Proef is in duplo ingezet.

De grafiek in figuur 3.20 laat een redelijke lineaire dosis-effect relatie zien. Deze relatie komt vooral naar voren bij de korte blootstellingduur.

In fig 3.21: is een dosis-effect relatie te zien die het midden houdt tussen een dosis-effect relatie met drempelwaarde en een sigmoïde dosis-effect relatie. Om hier onderscheid tussen te maken zouden er in de lagere concentraties meer

meetgegevens beschikbaar moeten zijn. Het onderscheid is van belang omdat een sigmoïde dosis-effect relatie in principe geen no-effect-level heeft (Kooiman,1981).

3.6 Celsuspensie verkrijgen uitweefsel uit *Chironomus riparius* (Vedermug) larven

Alle in 2.4.3 onder materiaal en methoden beschreven methode om voldoende cellen te verkrijgen zijn mislukt.

3.7 De aanwezigheid van lysosomen in cellen van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

Tabel 3.3: cellen in aantallen per 25 hokken van de telkamer die kleuring door neutraal rood lieten zien. Rood + geeft cellen aan die organellen hadden met een grootte van ¼ deel van de totale cel die neutraal rood gekleurd waren.

Neutraal rood kleuring <i>Dreissena polymorpha</i> cellen				
niet gekleurd	rood normaal	rood +	totaal	
147	46	7	200	

Uit deze steekproef is gebleken dat 26,5 % van de cellen neutraal rood kleuring vertoonde, en dat in 3.5 % van de cellen grote organellen neutraal rood gekleurd waren.

4 Discussie en conclusies

4.1 Cometassay met *Daphnia Magna*

De eerste concentratie waarbij een significant verschil wordt aangetoond met de controle is in fig. 3.1 lager dan de eerder waargenomen concentratie van 56 µg/l 4-NQO (den Besten en Tuk, 2000). Het experiment dat is weergegeven in figuur 3.2 laat pas bij 210 µg/l een significante afwijking zien ten opzichte van de blanco. Ook valt op dat de waarden uit figuur 3.1 bij vergelijkbare concentraties gemiddeld hoger liggen dan in figuur 3.2. Dit komt waarschijnlijk doordat de staartlengtes van de verschillende experimenten door verschillende personen zijn gemeten. Hierbij had de één de neiging om staarten langer te meten dan de ander. Grote spreiding in de meetgegevens zorgt voor een minder gevoelige test. De spreiding in de comet response kan door verschillende factoren worden veroorzaakt.

Factor 1: Volgens een vast patroon worden de eerste 50 cellen die men tegen komt gemeten. Als er door onregelmatigheden in de bereiding van de preparaten of door verschillen in de natuurlijke achtergrond DNA schade veel lange staarten liggen op de plekken waar de staartlengtes worden gemeten, kan dit leiden tot een grotere spreiding binnen de preparaten en een kleiner onderscheidend vermogen tussen de preparaten.

Factor 2: Maar waarschijnlijk wordt een groter deel van de spreiding veroorzaakt doordat er bij de cometassay met de *Daphnia Magna* wordt gewerkt met cellen die uit het gehele organisme komen. Verschillende celtypen kunnen op verschillende manieren reageren op contaminanten en daardoor voor spreiding in meetwaarden zorgen.

Factor 3: Het gegeven dat het bij deze testen om een in vivo blootstelling ging, waardoor de blootstelling niet gelijk was voor alle cellen, leidt ook tot een grotere spreiding in gemeten staartlengtes.

Factor 4: Spreiding door verschillen in achtergrond DNA schade.

Dit kan worden tegengegaan door het toevoegen van antioxidanten aan de oplossing waarin de organismen tijdens de blootstellingsperiode verblijven. Deze antioxidanten zorgen er voor dat vrije zuurstofradicalen, die vrijkomen bij normale respiratieprocessen in een cel, worden weggevangen. Het ontstaan van vrije zuurstofradicalen kan ook door toxicanten komen. Zoals in de inleiding al beschreven kunnen vrije zuurstofradicalen met DNA moleculen reageren. Dit heeft DNA strengbreuken en andere DNA fouten tot gevolg.

Een manier om het aantal strengbreuken te verhogen bij gelijke concentraties zou het toevoegen van een DNA-reparatie remmer zoals Cytosine-β-d-arabinofuranoside (ara-C, remmer van DNA synthese) kunnen zijn. Punt mutaties en andere DNA schade die niet rechtstreeks tot strengbreuken leiden zorgen voor tijdelijke enkelstrengs breuken tijdens het reparatie proces. Dat fouten niet meer worden gerepareerd zou moeten leiden tot een hogere respons bij blootstellingen aan genotoxische stoffen. Dit omdat de breuken die ontstaan tijdens het repareren (zie fig. 1.3 in bijlage) niet meer gerepareerd kunnen worden. Deze hypothese is bevestigd door onderzoekers die Cytosine-β-d-arabinofuranoside hebben toegevoegd tijdens hun experimenten. De toevoeging van de reparatie remmer leidde tot een

verhoging van het aantal strengbreuken in CHO-K1 cellen (ovarium cellen van een Chinese hamster) (Blakey en Douglas, 1990)

4.1.1 DNA reparatie test met de *Daphnia magna*

Uit een artikel van Speit en Hartman (Speit & Hartman, 1995) over de bijdrage van "excision repair of DNA" op de gemeten effecten in de cometassay blijkt dat de door hen gemeten respons voor een groot deel afhangt van de activiteit van het "excision repair" mechanisme. Om dit te bewijzen hebben Speit en Hartman cometassay proeven gedaan met twee verschillende menselijke cellijnen, een normale cellijn (MRC5CV1) en een cellijn waarin het "excision repair" mechanisme niet meer werkte (XP12ROSV). Deze cellijnen stelden de onderzoekers bloot aan verschillende mutagene stoffen waaronder 4-NQO. Tevens werd gekeken naar de effecten van het toevoegen van de DNA reparatie remmende stof Aphidicolin (APC). APC remt de DNA polymerisatie van de complementaire streng na het verwijderen van de DNA streng met de fout erin (zie fig. 1.3 in de bijlage).

Uit de proeven van Speit en Hartman blijkt dat bij gelijke blootstelling de cellen waarin het "excision repair" mechanisme niet werkte (XP12ROSV cel lijn) nauwelijks DNA strengbreuken laten zien, terwijl de gewone cellen (MRC5CV1 cellijn) wel meetbare schade laten zien. Dit verschil komt door het ontbreken van strengbreuken die ontstaan zijn door het DNA reparatie systeem in de cellen waarin dit reparatie systeem niet meer werkt.

Ook de sterk verhoogde DNA migratie bij de gewone cellen na toevoeging van de DNA reparatie remmende stof Aphidicolin (APC, CAS nr. 38966-21-1) en het uitblijven van deze verhoging bij de XP12ROSV cel lijn wijst op het belang van het "excision repair" mechanisme bij de grote van de gemeten respons.

Uit een test met menselijke lymfocyten die waren blootgesteld aan UV-straling bleek dat het maximum aantal strengbreuken werd gemeten ongeveer een uur na de blootstelling (Green et al., 1992). Ook hieruit blijkt de grote invloed van het "excision repair" mechanisme.

Uit het DNA reparatie experiment komt duidelijk naar voren dat *Daphnia magna* beschikt over een DNA-reparatie systeem. Dit systeem blijkt redelijk snel single strand DNA breuken te repareren. In een artikel over de oorsprong van DNA strengbreuken werd aangegeven dat bij eerdere experimenten de waargenomen DNA strengbreuken veroorzaakt worden door processen die te maken hebben met geprogrammeerde celdood (apoptose) (Eastman & Barry, 1992). Maar de waargenomen reparatie van DNA in het DNA reparatie experiment (fig 3.3 en 3.4) van dit onderzoek duidt op het uitblijven van processen die gestuurd worden door apoptose. Dit omdat onder het proces van apoptose geen reparatie plaatsvindt. Ook zal bij apoptose een redelijk uniforme respons op de chemicaliën worden verwacht.

DNA reparatie is onder meer eerder waargenomen door Mitchelmore en Chipman, 1998. DNA reparatie in aquatische organismen zou langzamer zijn dan bij zoogdieren, (Maccubbin, 1994, Walton et al, 1984 en Espina en Weiss, 1995) maar de waargenomen snelheid van reparatie bij deze test laat zien dat wel degelijk rekening moet worden gehouden met de effecten van DNA reparatie op de gemeten strengbreuken.

De vraag rijst wat de effecten van een kortstondige blootstelling aan genotoxische stoffen op een organisme zijn. Wat is de ecologische relevantie van een effect dat duidelijk te repareren valt, en dus tijdelijk is? De meeste vervuilingen in oppervlaktewater zijn van tijdelijke aard, het betreft vaak puntlozingen die vanwege *stroming, biodegradatie en andere processen niet lang in het systeem blijven of beschikbaar zijn.*

Het is duidelijk dat DNA reparatie energie kost, en dat energie die gebruikt wordt om DNA te repareren niet kan worden gebruikt voor andere functies zoals voortplanting of groei. Den Besten en Tuk hebben onderzoek gedaan naar de relatie tussen effecten gemeten in de neutraal rood retentie test en de cometassay en effecten op life history parameters van de *Daphnia magna* (den Besten en Tuk, 2000). Hieruit kwam naar voren dat bij langdurige blootstelling (21 dagen bij overleving/reproductie en het eerste broedsel bij de cometassay) de effecten gemeten met de cometassay gerelateerd kunnen worden aan de parameters overleving en/of reproductie. Deze bevinding zou een ondersteuning vormen voor het verdere gebruik van de Neutraal rood retentie test en de cometassay als vroeg waarschuwingssysteem bij *Daphnia magna*.

Tijdens het repareren van DNA fouten kunnen opnieuw fouten ontstaan zoals mismatching, of dubbele strengbreuken. Ook kunnen tijdens het reparatie proces genen niet meer correct worden afgelezen waardoor de eiwit productie en vorming van enzymen ernstig kan worden ontwricht. Hierdoor gaat de algemene fitnes van het organisme achteruit, en kunnen fouten ontstaan die het karakter van tijdelijk ontstijgen. Theoretisch kan een korte blootstelling onder de letale dosis dus weldegelijk effect hebben op life history parameters zoals overleving en reproductie.

Genotoxische stoffen kunnen een opeenvolging van genetische veranderingen veroorzaken die uiteindelijk kunnen leiden tot ongecontroleerde celdeling (kanker) (Weiberg, 1989). Genotoxische stoffen kunnen nog andere toxische responses veroorzaken zoals bijv. overerfbare defecten door mutaties in de voortplantings cellen en/of genetische fouten in ongeboren jongen. Effecten op de reproductie van organismen kunnen een grotere bedreiging zijn voor populatie parameters dan de carcinogene effecten. (Mitchelmore en Chipman, 1998) Een veelvoud van mutaties veroorzaakt door genotoxische stoffen bleken de relatieve fitness van verscheidene onderzochte organismen te verminderen (De Flora *et al*, 1991).

Een methode om de respons van de cometassay bij blootstelling aan genotoxische stoffen sterk te verhogen, zou het toevoegen van het hierboven al beschreven DNA reparatie remmende stof Aphidicolin (APC) zijn. Deze stof stopt het proces van DNA reparatie op het moment dat de streng met de DNA fout er uit is geknipt (figuur 1.3 bijlage). Hierdoor wordt voorkomen dat de overgebleven complementaire streng kan worden gebruikt als template voor DNA- polymerisatie. Alle DNA fouten kunnen hierdoor uiteindelijk als strengbreuk worden gemeten.

4.2 Cometassay met de *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

4.2.1 Cometassay na in vivo blootstelling van *Dreissena polymorpha* aan 4-NQO

Als men de gemiddelde staart lengte met het "tailmoment" vergelijkt, blijkt dat het tailmoment een betere dosis respons laat zien. Hierdoor zijn de gemeten waarden eerder significant afwijkend van de controle preparaten (vergelijk bijvoorbeeld figuur 3.6 met 3.7). Wat opvallend is aan tailmoment in zowel figuur 3.7 als 3.10 is de grote spreiding tussen de duplo's. Dezelfde verschillen zijn ook waar te nemen in de staartlengte metingen, alleen wat minder. Dat de waargenomen verschillen tussen de duplo's nagenoeg gelijk zijn tussen de staartlengte en het tailmoment is te verwachten. De staartlengte en het tailmoment worden op dezelfde cellen gemeten, en de tailmoment bestaat uit de verhouding tussen de staartlengte en de intensiteit van de kleuring.

Het verschil tussen controle 1 en controle 2 is bij het gemiddelde tailmoment van figuur 3.7 veel groter dan bij figuur 3.6. Dit kan komen doordat er in controle 2 veel lange en brede staarten te zien waren (zie fig 3.8).

Deze voor een controle grote variatie kan komen door het gebruik van een kieuwboog van een niet gezonde driehoeksmossel en/of een extra gevoelig exemplaar. Ook kan een fout tijdens de procedure om een celsuspensie te krijgen oorzaak zijn van een verhoogde respons. Teveel collagenase kan schadelijk zijn voor cellen. Het verschil in respons tussen de cellen komt ook tot uiting als men naar de verdeling van de tailmomenten kijkt van controle 2 (figuur 3.13) en deze vergelijkt met die van controle 1 (figuur 3.12). Bij controle 2 zijn er relatief veel cellen met een groot tailmoment. De waarden van de tailmomenten zijn in te delen in drie groepen. De verschillen in respons van deze drie groepen kan veroorzaakt worden doordat drie verschillende driehoeksmosselen hebben bijgedragen aan de celsuspensie. Als de mate van respons echter alleen bepaald wordt door de afkomst van een cel, zou er een min of meer gelijke verdeling moeten zijn in aantallen per respons groep. Deze eerlijke verdeling wordt niet gehaald. Ook wordt deze driedeling niet gezien bij controle 1 (figuur 3.12), die is uitgevoerd met cellen uit dezelfde celsuspensie.

De hierboven beschreven mogelijke oorzaken verklaren nog niet het gemeten verschil in het gemiddelde tailmoment tussen de twee controlepreparaten. De cellen uit controle 1 en controle 2 komen uit dezelfde celsuspensie, en hebben dezelfde behandeling ondergaan. Verschillen in gevoeligheid tussen verschillende celsoorten of verschillen in gevoeligheid binnen dezelfde celsoort kunnen oorzaak zijn van de gemeten verschillen in respons. Verschillen in DNA reparatie activiteit zouden kunnen leiden tot verschil in respons tussen de cellen in een controle. Grote spreiding in respons van cellen uit het dezelfde organisme in controle bepalingen is eerder waargenomen door Wilson *et al* (1998). Wilson *et al* deden hun onderzoek op kieuwcellen van *Mytilus edulis*, een zoutwater mossel.

Door het gebruik een gepoelde celsuspensie van kieuwbogen uit drie mosselen is geprobeerd de mogelijke variatie in gevoeligheid binnen de soort uit te middelen.

Verschillen in respons tussen de duplo's kunnen worden veroorzaakt door een verschil in blootstelling. De mosselen hebben de mogelijkheid om tijdens de blootstelling hun schelpen te sluiten om zo te ontkomen aan blootstelling. Dit gedrag werd tijdens de

proeven niet waargenomen, maar het is niet uitgesloten dat 1 van de mosselen in een de pot vaker zijn schelp dicht had dan de andere mosselen. Dit verschil in blootstelling zou men kunnen voorkomen door het sluiten van de schelpen tegen te gaan. Dit door bijvoorbeeld een stokje (tandenstoker) tussen de schelpen te plaatsen, dit veroorzaakt wel extra stress bij het organisme. Verder kan variatie in duplo's kan worden veroorzaakt door de aanwezigheid van 1 of meerdere minder gevoelige driehoeksmosselen per concentratie.

Het kleiner worden van de gemiddelde staartlengte en tailmoment bij de lagere concentraties (bijvoorbeeld 37.5 µg 4-NQO/l in fig 3.6) zoals onder andere waargenomen in figuur 3.6 en 3.7, duidt op het actief zijn van reparatie mechanismen. Dit mechanisme is enzymatisch (Robison *et al*, 1984. Bootsma en Hoeijmakers, 1994) en kan daardoor gereguleerd worden. Er kan een bepaalde grens zijn waarboven het systeem geactiveerd wordt (Black *et al*, 1996). Hierdoor kunnen er bij lage concentraties 4-NQO kleinere staartlengtes en tailmomenten worden gemeten dan bij de controle waar het DNA reparatie mechanisme niet is geactiveerd. Het DNA reparatie mechanisme kan echter ook op de top van zijn kunnen komen bij hogere concentraties, of zelfs buiten werking treden (Black *et al*, 1996).

De gemeten respons in de verschillende cellen was vaak extreem. Of er was nauwelijks sprake van een staart of een tailmoment, of er was een grote response te zien. Er was nauwelijks sprake van staartlengtes of tailmomenten tussen deze extremen. Dit zou kunnen duiden op apoptose bij cellen die een grote respons laten zien. Dit zou ook de waargenomen tweede piek verklaren in figuur 3.11. Een andere verklaring zou zijn dat de celsuspensie uit 2 celsoorten bestaat die allebei anders reageren op de behandeling van de cellen onder de cometassay methode en/of dat er sprake is van experimentele variatie.

Een manier om DNA schade in de controle tegen te gaan zou, naast het eerder genoemde gebruik van antioxidanten, het verminderen van de blootstelling duur aan collagenase kunnen zijn. Een te lange blootstelling bij voldoende hoeveelheden kan leiden tot celschade. Ook het werken op ijs om eventuele celprocessen te remmen zou eventuele schade opgelopen onder de bewerkingen tot het minimum moeten beperken. Het koud werken was bij de cometassay's met de driehoeksmossel minder dan bij de testen met *Daphnia magna* omdat in het nieuwe lab, waar alle mossel testen zijn gedaan, nog geen ijsmachine aanwezig was. Als dusdanig waren enkele stappen van de test minder gekoeld dan mogelijk.

Uit Black *et al* (1996) blijkt dat er weefselafhankelijke responses bestaan. Ook stofafhankelijke respons en soortafhankelijke response zijn algemeen. Dit is in dit onderzoek terug te zien. Bijvoorbeeld bij de waargenomen vermindering van DNA schade bij lage concentraties 4-NQO blootstelling bij de driehoeksmossel (zie bijvoorbeeld figuur 3.6). Dit is niet waargenomen bij de blootstelling aan EMS (zie figuur 3.16). Ook bij de experimenten met *Daphnia magna* is geen vermindering van DNA schade waargenomen bij blootstelling aan lage concentraties. Het verschil tussen de 2 soorten kan komen door een verschil in snelheid en effectiviteit van de afzonderlijke DNA reparatie mechanismen.

4.2.2 Cometassay na in vitro blootstelling van *Dreissena polymorpha* aan 4-NQO

Wat opvalt aan de gegevens zijn de staartlengtes bij de controle preparaten. Deze liggen duidelijk hoger dan bij de in vivo blootstellingen. Dit kan komen door de langere tijd dat de cellen in agarose hebben gezeten ten opzichte van de in vivo blootstellingen. De langere staartlengten bij een in vitro blootstelling ten opzichten van een in vivo is eerder waargenomen bij experimenten met de watervlo *Daphnia magna* (Tuk, 1999).

Controle 1 (con 1) laat bij zowel de staartlengte als tailmoment een hoger effect zien dan controle 2 (con 2). Deze verschillen zijn waarschijnlijk ontstaan tijdens de behandeling van de preparaten door variatie tussen cellen uit hetzelfde organisme. Dit omdat de cellen in alle preparaten uit dezelfde celsuspensie kwamen. Verlaging van respons bij lage concentraties, zoals bij de in vivo blootstelling waargenomen, is hier afwezig. Dit kan komen door het uitblijven van voltooide DNA schade reparatie. De blootstelling was maar 2 uur en bij 5°C. Zoals ook bij de in vivo blootstelling bleek het tailmoment een mooiere dosis effect relatie te laten zien dan de staartlengte. Het tailmoment laat vooral bij de hogere concentraties een duidelijker verschil tussen de concentraties zien dan bij de staartlengte. Het lijkt erop dat de staartlengte bij hoge doses tegen een maximale respons aanloopt. De duur van de electroforese en het gebruikte voltage laten gewoon geen verdere migratie toe. Maar omdat bij een groot aantal strengbreuken de intensiteit van de staart groter zal worden zal het tailmoment, die kijkt naar het product van de staart lengte en intensiteit, ook bij hogere concentraties een betere dosis- effect relatie laten zien. De staartintensiteit is nog niet gelimiteerd bij de toegepaste manier van electroforese.

De in vitro blootstelling in *Dreissena polymorpha* laat bij de staartlengte bij de laagste dosis al een significant effect zien ten opzichte van de controle preparaten. De waarde van 37.5 µg 4-NQO/l (de LOEC, (lowest observed effect concentration) is een factor 2 lager dan het laagste significantie niveau waargenomen bij de in vivo blootstelling (een LOEC van 75 µg 4-NQO/l) en meer dan een factor 12 lager dan de LC50 na vijf dagen. Doordat 37.5 µg/l de laagste ingezette concentratie was, is het waarschijnlijk dat het verschil tussen de LOEC's van de in vivo en in vitro testen nog groter is. Om dit te controleren zal een nieuwe test moeten worden uitgevoerd met een concentratie reeks tussen de 0 en 37.5 µg 4-NQO/l.

Door de grotere gevoeligheid van de in vitro test en de kortere blootstellingsduur van de proef, is deze proef zeer geschikt om snel monsters te onderzoeken op genotoxische eigenschappen. Ook al omdat in alle preparaten gebruik kan worden gemaakt van cellen uit dezelfde organismen. Het gegeven dat alle cellen min of meer aan gelijke concentraties toxische stof worden blootgesteld komt een uniforme respons ook ten goede.

De methode kan misschien nog gevoeliger worden gemaakt door bijv. het toevoegen van antioxidanten tijdens en/of voor de blootstelling om DNA schade door vrije zuurstof radicalen tegen te gaan. Hierdoor zal in ieder geval de gemeten DNA schade in de controle minder moeten worden. De al eerder beschreven DNA reparatie remmende stof Aphidicolin (APC) zal kunnen zorgen voor een verhoogde respons na

blootstelling. Hierdoor kan de test misschien bij nog lagere concentraties genotoxische effecten aantonen.

Een nadeel van het gebruik van de in vitro test is echter de vertaling naar ecologisch relevante parameters. Bij een in vivo experiment is voor veel cellen de concentratie waaraan ze worden blootgesteld lager dan bij cellen die rechtstreeks worden blootgesteld. De cellen die niet geheel aan de buitenkant van het organisme liggen, worden bij een in vivo experiment aan lagere concentraties blootgesteld dan in het monster is opgelost. Door complexvorming, accumulatie en andere processen worden de cellen steeds minder lang blootgesteld hoe dieper je het organisme in gaat. Dit leidt tot vermindering van de gemiddelde respons en tot een grotere spreiding van de meetgegevens. Doordat de effecten van de hierboven beschreven mechanismen moeilijk te voorspellen zijn, is het even moeilijk om met resultaten uit een in vitro test voorspellingen te doen over verwachte effecten bij een in vivo blootstelling.

De beste manier om ecologisch relevante gegevens te verkrijgen met de Cometassay is het blootstellen van complete organismen in kooitjes op de plekken in het water waar gegevens van verzameld moeten worden. Dit omdat ook de omstandigheden waaronder de organismen worden blootgesteld van invloed kunnen zijn op de gemeten respons. Door secundaire stress, zoals zuurstofgebrek, temperatuur extremen of voedselgebrek, kan de respons afwijkend zijn van testen die onder optimale (lab) omstandigheden worden uitgevoerd.

4.2.3 Cometassay na in vivo blootstelling van *Dreissena polymorpha* aan EMS

EMS is een stof die duidelijk minder genotoxisch is dan 4-NQO. De concentraties EMS waaraan werd blootgesteld lagen een factor 1000 hoger dan bij 4-NQO. Toch lag de hoogste gebruikte concentratie verder van de LC50 na 5 dagen blootstelling af dan bij 4-NQO. 320 mg EMS /l is 0.35 keer de LC50 van EMS tegen 320 µg 4-NQO/l wat 0.69 keer de LC50 van deze stof was (zie tabel 3.2).

De verlaging van de respons bij lage concentraties, zoals waargenomen bij de in vivo blootstelling aan 4-NQO, is hier niet zichtbaar. Misschien is er wel sprake van een verlaging van de respons bij lage concentraties, maar is de gekozen begin concentratie van 40 mg EMS/l al te hoog om dit effect waar te nemen. Een nieuwe proef met lagere concentraties kan hier een antwoord op geven. Het grote verschil tussen de duplo's bij het tailmoment die zijn blootgesteld aan 320 mg EMS/l is opvallend. Dit verschil is duidelijk minder als naar de staartlengte wordt gekeken. Grote verschillen tussen duplo's zijn al eerder waargenomen, zoals in figuur 3.6 en 3.7. De gemeten verschillen zijn altijd groter bij de parameter tailmoment. Dit gegeven is ook terug te zien in het volgende onderwerp.

4.3 Vergelijking tussen alle controles van in vivo experimenten uitgevoerd met *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

Wat als eerste opvalt in figuur 3.18 is het grote verschil tussen de eerste test met 4-NQO en de rest van de in vivo testen in gemiddelde staatlengte. Dit verschil komt zeer waarschijnlijk door het veranderen van de instellingen van het beeld analyse systeem (comet Assay II systeem van Perceptive Instruments). De instellingen zijn na de eerste cometassay zo veranderd dat de achtergrondruis minder werd. Dit in combinatie met een aanpassing aan de fluorescentie microscoop, die hierdoor meer licht doorliet, zorgde er voor dat de fluoriderende DNA fragmenten beter zichtbaar waren. Dit resulteerde in gemiddeld langere staatlengten. Hierdoor ging het onderscheidend vermogen van de test vooruit. Controles die gedaan zijn met dezelfde instellingen laten bij de parameter "staatlengte" een redelijk gelijke response zien (fig 3.18). De verschillen zijn groter als er naar de parameter "tailmoment" wordt gekeken. Deze grote variatie in respons is ook waar te nemen tussen duplo's van eerdere proeven. Een paar cellen met een groot tailmoment hebben veel invloed op het gemiddelde tailmoment. Dat dit sterker telt bij het tailmoment dan bij de staatlengte komt doordat cellen zonder staart een tailmoment hebben dat zeer dicht bij nul ligt, terwijl alle cellen altijd minimaal een staatlengte hebben ten grote van de helft van hun kern. Dit door de toegepaste meetmethode van het beeldanalyse software die het midden van de kern gebruikt als begin van de staart.

4.4 Toxiciteits proef met *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

De toxiciteit proef met de *Dreissena polymorpha* is vooral uitgevoerd om meer inzicht te krijgen in de toxiciteit van de gebruikte stoffen. Omdat er niet of nauwelijks toxicologische data beschikbaar zijn over de gebruikte stoffen, is het moeilijk uitspraken te doen over de gevoeligheid van de *Dreissena polymorpha* ten opzichte van andere organismen. Als parameter werd er gekeken naar sterfte. Er zijn alleen data bekend van *Daphnia magna*. De LC50 na 2 dagen blootstelling aan 4-NQO kwam bij de *Daphnia magna* op 350 µg/l. Voor EMS lag de LC50 voor *Daphnia magna* na 2 dagen blootstelling op 314 mg/l (den Besten en Tuk, 2000). Dit tegenover een vergelijkbare LC50 van 16348 µg 4-NQO /l en een LC50 van 1788 mg EMS /l bij de driehoeksmossel (zie tabel 3.2). De LC50 van 4-NQO voor de Driehoeksmossel is waarschijnlijk in werkelijkheid lager. De gebruikte concentratie reeks was niet hoog genoeg om veel sterfte te meten na 2 dagen blootstelling.

Uit deze vergelijking blijkt dat *Daphnia magna* gevoeliger is voor deze 2 stoffen als gekeken wordt naar de parameter sterfte. Een deel van dit verschil in gevoeligheid kan worden verklaard door verschillen in blootstelling concentraties. Bijna alle cellen van een *Daphnia magna* staan rechtstreeks in contact met het water, en daarmee met de opgeloste toxische stoffen. Dit in tegenstelling tot de driehoeksmossel, die veel groter is. Cellen die aan de buitenkant van een orgaan liggen komen met hogere concentraties in aanraking dan de cellen die in het midden van het orgaan liggen. Ook kan de driehoeksmossel de inname van contaminanten nog enigszins reguleren door zijn kleppen te sluiten. Verder kunnen er nog meer verschillen zijn in de toxicokinetiek, metabolisme en compartimentatie van stoffen die de verschillen veroorzaken.

Tabel 4.1: tabel met toxiciteit gegevens van *Daphnia magna* en *Dreissena polymorpha* na 2 dagen (2d) en 5 dagen (5d) blootstelling.

		Daphnia magna			Dreissena polymorpha	
		LC50	LOEC _{sterfte}	LOEC _{comet}	LC50	LOEC _{comet}
4-NQO	2 d	350 µg/l	300 µg/l	21 µg/l		75 µg/l
	5 d				461 µg/l	
EMS	2 d	314 mg/l	460 mg/l	100 mg/l		100 mg/l
	5 d				898 mg/l	

Alle bepalingen met de cometassay worden alleen op levende organismen gedaan. Als er een LOEC_{comet} is, is deze altijd lager dan de LOEC_{sterfte}. Het verschil tussen de LC50 na 5 dagen blootstelling van beide stoffen en de LOEC's (in dit onderzoek de laagste concentratie waarbij een significant verschil met de controle werd vastgesteld) na twee dagen blootstelling die met de cometassay met de parameter staartlengte zijn bepaald zijn de volgende: LC50 4-NQO = 461 µg/l ; LOEC = 75 µg/l. Dit verschilt meer dan een factor 6. LC50 EMS = 898 mg/l ; LOEC = 100 mg/l. Dit verschilt een factor 9. De LOEC_{comet} zoals bij deze experimenten gevonden liggen tussen de factor 6 en 9 lager dan de LC50 na een blootstelling van 5 dagen. De factor 6 die de LOEC van 4-NQO lager is dan de LC50 is kleiner dan het verschil tussen de LOEC_{comet} van EMS en de LC50 van deze stof. Dit kan komen door de verlaagde respons in comet staartlengtes die 4-NQO bij lage concentraties laat zien ten opzichte van de controle. Hierdoor wordt de LOEC_{comet} van 4-NQO hoger dan bij een normale respons bij de lage concentraties.

Het gegeven dat de grotere mosselen het eerst overleden duidt op multi-stress. Tijdens de test is niet gevoerd. Dit zorgde voor voedselgebrek bij de blootgelegde organismen, die toch al meer energie nodig hadden om eventuele opgelopen schade te repareren of opname van de toxische stof te reguleren. Het is bekend dat grotere organismen meer energie verbruiken. Grote mosselen hebben onder gelijke omstandigheden meer energie nodig dan hun kleinere soortgenoten, omdat ze meer biomassa hebben. Ook zijn grotere mosselen over het algemeen ouder. De grote mosselen zullen hierdoor het eerst last hebben van dit voedselgebrek. Hierdoor zullen zij minder goed tegen de toxische stoffen kunnen dan hun kleinere soortgenoten.

4.5 Celvitaliteit metingen aan de celsuspensie van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

Uit de celvitaliteit metingen bleek dat de optimale osmolariteit voor de kieuwcellen van de driehoeksmossel tussen de 80 en 160 mOsm/l ligt. Bij de gebruikte methode om een "singlecel" suspensie te krijgen blijkt dat bij deze waarden de vitaliteit rond de 100% ligt.

Als er gekeken wordt naar het aantal cellen dat vrij komt bij een isolatie, blijkt dat het aantal cellen per milliliter buffer negatief is gecorreleerd met de celvitaliteit. Hoe hoger de vitaliteit hoe lager het aantal cellen per milliliter in de door ons onderzochte range. Blijkbaar zorgt een verstoring van de osmolariteit er voor dat de banden tussen cellen makkelijker los komen bij blootstelling aan collagenase.

De verkregen celsuspensies bleken goed in staat om in de buffer te overleven bij 4°C. Zelfs na een week zagen de cellen er in de concentraties 80 en 160 mOsm/l nog goed uit (niet getoonde data). Dit is een belangrijk gegeven als aan testen met deze cellen wordt gedacht. De cellen blijken ongevoelig te zijn voor kleine variatie in de buffer samenstelling, en verkregen celsuspensies kunnen een tijdje bewaard worden bij een temperatuur van 4 °C in het donker.

4.6 Celsuspensie verkrijgen van weefsel uit *Chironomus riparius* (Vedermug) larven

Alle gebruikte methoden om een celsuspensie met voldoende cellen te verkrijgen zijn mislukt. Telkens bleken er te weinig cellen in de suspensie te zitten om een cometassay mee uit te voeren. Enzymatische methoden resulteerde niet in de gewenste weefsel afbraak bij de *Chironomus riparius*. De samenstelling van het bindweefsel zal naar alle waarschijnlijkheid afwijken van het bindweefsel van bijvoorbeeld de driehoeksmossel. Vedermuggen bestaan bijvoorbeeld voor een groot deel uit Chitine bindweefsel. Dit Chitine weefsel is veel moeilijker afbreekbaar dan bindweefsel uit een mosselkieuw boog. Zelfs de bij de *Daphnia magna* wel succesvolle methode van het door een gaasje drukken van het organisme mislukte bij de *Chironomus riparius*. De cellen die bij de *Daphnia magna* in de celsuspensie komen zijn mogelijk voornamelijk cellen die vrij los in het organisme zitten. Larven van de *Chironomus riparius* hebben blijkbaar minder van deze losmazige celgroepen.

Het is niet gelukt een "singlecel" suspensie te verkrijgen met voldoende cellen. De mogelijkheden voor het gebruik van verdermuggen larven bij het uitvoeren van een cometassay zijn hierdoor nu nog beperkt. Andere methoden om een "singlecel" suspensie te krijgen zijn nodig. Het gebruik van het enzym Chitinase, een enzym die Chitine bindweefsel afbreekt, zou een mogelijkheid kunnen bieden om voldoende cellen in suspensie te krijgen. Een andere mogelijke oplossing voor het gebrek aan losse cellen kan het beginnen van een celkweek zijn met cellen uit de *Chironomus riparius*. Een nadeel van het gebruik van cellen uit een celkweek is de onmogelijkheid om in vivo experimenten uit te voeren. Een voordeel is het hebben van gelijke cellen, waardoor de spreiding in respons kleiner zou moeten worden.

Het gebruik van materiaal van *Chironomus riparius* voor de neutraal rood retentie test is nog niet uitgesloten. De methode van een darm prepareren, zoals toegepast op de *Daphnia magna*, is ook toe te passen op de *Chironomus riparius*. Een voorwaarde hiervoor is natuurlijk wel het aanwezig zijn van kleurbare lysosomen.

4.7 De aanwezigheid van lysosomen in cellen van *Dreissena polymorpha* (Driehoeksmossel)

De waargenomen kleuring met neutraal rood in een kwart van de cellen (tabel 3.3) laat zien dat er in een deel van de kieuw cellen van de *Dreissena polymorpha* kleurbare en zichtbare lysosomen aanwezig zijn. Het opvallende is dat niet alle cellen een kleuring lieten zien. Dit kan komen door de aanwezigheid van verschillende

celtypen in een kieuw. Deze verschillende celtypen hebben verschillende hoeveelheden lysosomen.

Ook de grootte van de lysosomen kan per celtype verschillen. Dit zou de aanwezigheid van grote fel gekleurde organellen kunnen verklaren die in 3.5 % van de cellen worden waargenomen. Maar uit eerder onderzoek naar morfologische lysosomale veranderingen bij de *Dreissena polymorpha*, bleek het groter worden van lysosomen een niet-specifieke stress biomarker te zijn (Giamberini en Pihan, 1997). De grote lysosomen kunnen dus een gevolg van een stress situatie zijn. De blootstelling aan collagenase in het proces om een celsuspensie te krijgen zou een stress kunnen zijn. Maar dan zijn niet alle cellen even gevoelig voor deze stress.

Als aanvulling op onderzoek naar morfologische lysosomale veranderingen dat al gedaan is met *Dreissena polymorpha* (Giamberini en Pihan, 1997) zou het uitvoeren van een neutraal rood retentie test op losse cellen wenselijk zijn.

Cellen uit een celsuspensie kunnen in een telkamer worden gekleurd. Er kan dan bijvoorbeeld gekeken worden naar 10 verschillende cellen per concentratie. Omdat de cellen in vakjes van een telkamer liggen kunnen cellen weer terug worden gevonden nadat er naar andere preparaten is gekeken. Het zou dus mogelijk moeten zijn om de neutraal rood retentietijd van een individuele cel te bepalen in plaats van dat van een stuk weefsel. Om de meting meer objectief te maken zou verder kunnen worden gedacht aan het meten van de kleurings intensiteit van een cel. Hierbij kan de cometassay beeldanalyse software misschien helpen. Eén van de parameters die de cometassay software meet is de totale intensiteit van een comet. Als meetkader van de software nu wordt ingesteld op de gemiddelde grootte van een cel, zou de totale intensiteit kunnen worden gemeten van de gekleurde cellen. Als dit meetkader onder het meten niet wordt veranderd kunnen de cellen in de tijd worden gevolgd en de terug lek worden gemeten. De verwachting is dat de terug lek zal leiden tot een verminderde totale intensiteit. Door de intensiteit in de tijd te volgen kan bijvoorbeeld de tijd tot de begin intensiteit met 50% is gedaald worden bepaald als eindwaarde.

4.8 Een blik vooruit

DNA strengbreuken worden toegeschreven aan drie verschillende gebeurtenissen: rechtstreekse DNA schade door contaminanten of vrije zuurstofradicalen, DNA reparatie en apoptose ofwel geprogrammeerde celdood (Eastman & Barry, 1992). De natuurlijke achtergrondschade aan baseparen in een organisme kan oplopen tot 100.000 bases per cel per dag. (Freiberg, 1985) Deze schade wordt voornamelijk veroorzaakt door vrije radicalen die ontstaan tijdens de gewone metabolische cycli.

Uit dit en eerder onderzoek naar de cometassay komt naar voren dat de gemeten respons beïnvloed wordt door een heel scala aan dynamische processen. Over processen zoals het DNA "excision repair" mechanisme is nog te weinig bekend. Wordt het proces gereguleerd, en zo ja, is er een drempelwaarde? Wat is de bijdrage van dit proces aan de totale hoeveelheid strengbreuken, en hoe verandert dit in de tijd? Allemaal interessante vragen waarmee rekening moet worden gehouden bij het interpreteren van de uitslagen van uitgevoerde cometassay's. Uit eerder onderzoek

bleek dat het aantal strengbreuken na het stoppen van de behandeling eerst nog omhoog gaat en na een tijdje weer naar beneden (Green *et al*,1992). De response heeft dus een maximum. De maximale respons kan verschillen per onderzochte stof en per organisme. Over de invloed van apoptose (geprogrammeerde celdood) op de gemeten response is ook nog te weinig bekend. Apoptose is een proces dat ook onder niet gecontamineerde omstandigheden voorkomt. De frequentie van deze "achtergrond" apoptose is echter onbekend en variabel. Moeten cellen die in de controle een grote repons laten zien als gevolgen van apoptose worden gerekend? En zo ja, neem je deze dan mee in de gemiddelden van de gemeten responses of worden de waarden er uitgelaten. Hoe onderscheid je de eventuele apoptose cellen in de hogere concentraties? Het is bijvoorbeeld helemaal niet uitgesloten, en zelfs meerdere keren geopperd (o.a. Eastman & Barry,1992), dat genotoxische stoffen het proces van apoptose induceren. Deze verhoging van het aantal cellen met apoptose zal voor een groot deel verantwoordelijk zijn voor het verhoogde gemiddelde aantal strengbreuken. Door meer onderzoek naar deze processen te doen kan een beter beeld worden verkregen van de rechtstreekse oorzaken van het waargenomen aantal strengbreuken. Met deze kennis kunnen waarnemingen ook beter gerelateerd worden aan eventuele populatie- en ecosysteem effecten.

4.8.1 Mogelijkheden van de cometassay

De cometassay bleek significante verschillen ten opzichte van controle preparaten te laten zien bij subletale concentraties. Hiermee is duidelijk geworden dat de cometassay bruikbaar is als biomarker in de *Daphnia magna* en de *Dreissena polymorpha*. De cometassay is een test die snel resultaat kan laten zien. Bij de in vitro blootstellingen kan bijvoorbeeld op een dag van 15 tot 20 monsters in duplo de genotoxiciteit worden bepaald. Het uitlezen van de preparaten is hierbij niet meegerekend. Het uitlezen kan bijvoorbeeld de volgende dag gebeuren. Eén slide uitlezen kost met behulp van het comet Assay II systeem van Perceptive Instruments ongeveer 10 minuten.

Ook voor blootstellingen op de plek van een eventuele verontreiniging in het veld is de cometassay geschikt. Niet alleen is de cometassay daar voor geschikt, maar ook de gekozen organismen zijn hiervoor geschikt. Driehoeksmosselen kunnen in een doorstroompot op de plaats van de vervuiling worden gehangen of gezet. De mosselen worden zo onder de ter plekke geldende omstandigheden blootgesteld. De gemeten respons zal op deze manier het dichtst bij de werkelijke schade liggen. De beschreven procedure kan ook worden uitgevoerd met *Daphnia*'s. Als deze veldblootstellingen een respons laten zien, en dus bruikbaar zijn, kan de cometassay met zowel de *Daphnia magna* en de *Dreissena polymorpha* worden opgenomen in biomonitoring programma's. Ook het toepassen in gecombineerde risico beoordeling programma's, zoals de triade aanpak, zijn denkbaar. Deze test zou een makkelijke en goedkope aanvulling kunnen zijn op het al bestaande instrumentarium.

4.8.2 Mogelijkheden van de Neutraal rood retentie test

Het principe van de neutraal rood retentie test is interessant en bruikbaar. Maar de gebruikte meetmethode is te afhankelijk van de persoon die de retentietijd bepaalt. De verandering van kleur bij terug lek van het lysosoom naar het cytosool is moeilijk te zien. Dit proces moet nog worden geoptimaliseerd. Een betrouwbaardere

meetmethode kan een goede verbetering vormen voor de neutraal rood retentie test. De eerder beschreven methode om de lichtintensiteit van lysosomen in individuele cellen te meten met behulp van het comet Assay II systeem van Perceptive Instruments is het proberen waard. Ook kunnen andere methoden worden bedacht, die bijvoorbeeld gebruik maken van een spectrofotometer. De neutraal rood retentie test is een test die nog verder ontwikkeld en uitgewerkt moet worden voordat hij kan worden opgenomen in biomonitoring programma's en gecombineerde risico beoordeling programma's.

5 Literatuur

Black, M.C., Ferrell, J.R., Horning, R.C. and Martin, L.K., Jr. (1996) DNA strand breakage in freshwater mussels (*Anodonta grandis*) exposed to lead in the laboratory and field. *Environmental toxicology and Chemistry* 15 (5), 802-808.

Blakey, D.H. and Douglas, G.R. (1990) The role of excision repair in the removal of transient benzo(a)pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 236, 35-41.

Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H.J. (1994) The molecular basis for nucleotide excision repair syndromes. *Mutation Research* 307, 15-23.

de Flora, S., Bagnasco, M. and Zanicchi, P. (1991) Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutation Research* 258, 285-320.

den Besten, P.J. and Tuk, C.W. (2000) Relation between responses in the neutral red retention test and the comet assay and life history parameters of *Daphnia magna*. In Press.

Devaux, A., Pesonen M. and Monod G. (1997) Alkaline Cometassay in Rainbow trout hepatocytes. *Toxicology in vitro* 11, 71-79.

Eastman, A. and Barry, M.A. (1992) The origins of DNA breaks: A consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Investigation*, 10(3), 229-240.

Edgar, W.D. and Meadows, P.S. (1969) Case construction, movement, spatial distribution and substrate selection in the larva of *Chironomus riparius* Meigen. *Journal of Experimental Biology* 50, 247-253.

Espina, N.G. and Weiss, P. (1995) DNA-repair in fish from polluted estuaries, *Mar. Environ Res.* 39 (1-4), 309-312.

Freidberg E.C. (1985) *DNA Repair*. W.H. Freeman and Co., New York.

Gallepp, G.W. (1979) Chironomid influence on phosphorus release in sedimentwater microcosms. *Ecology* 60, 547-556.

Gedik, C.M., Even, S.W.B. and Collins, A.R. (1992) Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, *Int. J. Radiat. Biology* 62, 313-320.

Giamberini and L. Pihan, J.C. (1997) Lysosomal changes in the hemocytes of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to lead and zinc, *Diseases of aquatic organisms* 28, 221-227.

Green, M.H.L., Lowe, J.E., Harcourt, S.A., Akinluyi, P., Rowe, T., Cole, J., Anastey, A.V. and Arlett, C.F. (1992) UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique. *Mutat. Res.* 273, 137-144.

Janssen, A.W. en De Vogel, E.F. (1965) Zoetwatermollusken van Nederland. Den Haag.

Kooijman, S.A.L.M. (1981) Parametric analysis of mortality rates in bioassays. *Water Res.* 15, 107-119.

Leentvaar, P. (1943) Over de biologie van eenige schelpdieren. *De levende natuur* 64, 273-279.

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. and Darnell, J. (1995) *Molecular cell biology*. W.H. freeman and company, New York.

Maccubbin, A.E. (1994) DNA adduct analysis in fish: laboratory and field studies. *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*, Lewis Publishers, Boca Raton, 267-294.

Mitchelmore, C.L. and Chipman, J.K. (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research* 399, 135-147.

Parma, S. and Krebs, B.P.M. (1977) The distribution of chironomid larvae in relation to the chloride concentration in a brackish water region of the Netherlands. *Hydrobiologia* 52, 117-126.

Robison, S.H., Cantoni, O. and Costa, M. (1984) Analysis of metalinduced lesion and DNA repair replication in mammalian cells. *Mutation Research* 131, 173-181.

Shugart, L. (1990) *Biological monitoring: testing for genotoxicity. Uit Biomarkers of environmental contamination*, Lewis Publishers, Chelsea, 217-227.

Sina, J.F., Bean, C.L., Dysart, G.R., Taylor, V.I. and Bradley, M.O. (1983) Evaluation of the alkaline elution /rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic /mutagenic potential, *Mutation Research* 113, 357-391.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*. 175, 184-191.

Speit, G and Hartmann, A. (1995) The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10(6), 555-559.

Tuk, C. (1999) Ontwikkeling van een neutraal rood retentie test en de cometassay in *Daphnia magna*: biomarkers van fysieke conditie en genetische schade. Werkdocument RIZA nr. 99.165 X.

van der Veen, J.C.M. Ecotoxicologie, Het probleem van de Extrapolatie. Scriptie.

van Gestel C.A.M. and Van Brummelen T.C. (1996) Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.

van Straalen, N.M. en Verkleij, J.A.C. (1993) Leerboek Oecotoxicologie. VU uitgeverij.

Walton, D.G., Acton, AB. And Stich, H.F. (1984) DNA repair synthesis following exposure to chemical mutagens in primary liver, stomach and intestinal cells isolated from Rainbow trout. *Cancer Res.*44 (3), 1120-1121.

Weinberg, R.A. (1989) Oncogenes, antioncogenes and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 49, 3713-3721.

Williams D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.

Wilson, J.T., Pascoe, P.L., Parry, J.M. and Dixon, D.R. (1998) Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutation Research* 339, 87-95.

6 Bijlagen

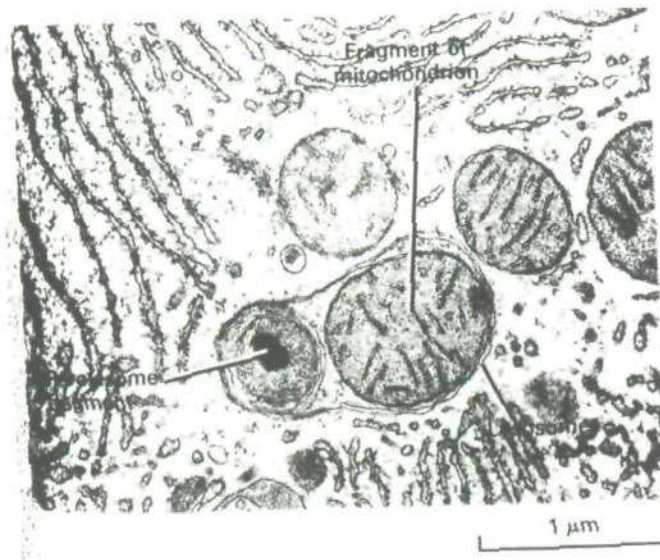
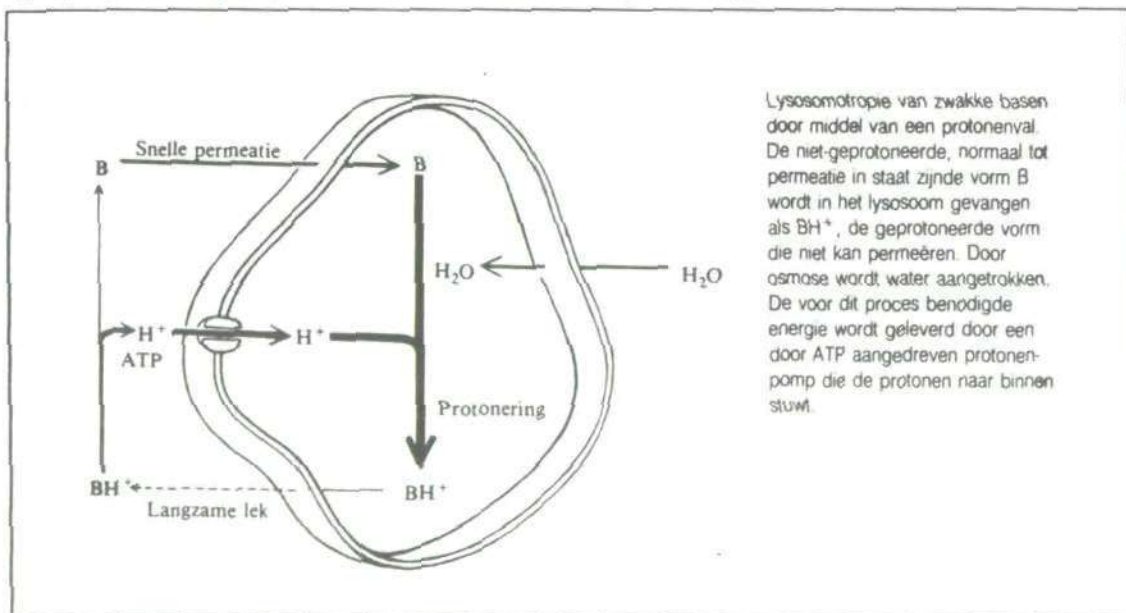


Fig. 1.1: Secundaire lysosoom (fagolysosoom), bevat membraanresten die worden verteerd.

Figuur 2. Lysosomotropie van een zwakke base als neutraal rood, hier aangegeven als B:



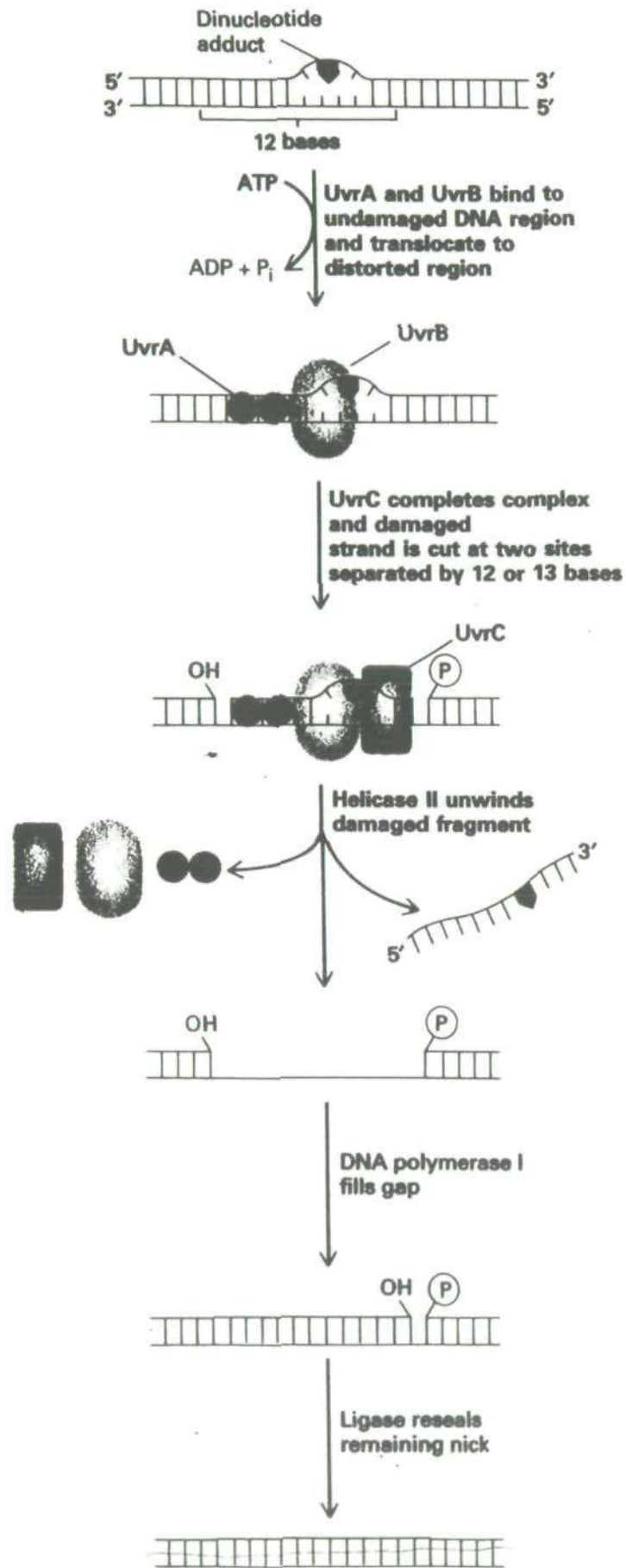


Fig. 1.3: Excision repair mechanism bij *E.coli*.

Bereiding en samenstelling van het DSW

. Samenstelling van de stamoplossingen.

Samenstelling van oplossing I

1	NaHCO ₃	50 g	merck 6329
2	KHCO ₃	10 g	merck 4854
3	gedestilleerd water	1 liter	

Los 1 en 2 op in 3.

Steriliseren door filtratie over membraanfilter 0,2 µm.

Samenstelling van oplossing II

1	CaCl ₂ .2H ₂ O	100 g	merck 2382
2	gedestilleerd water	1 liter	

Los 1 op in 2.

Steriliseren in autoclaaf 45 min bij 120 °C.

Samenstelling van oplossing III

1	MgSO ₄ .7H ₂ O	90 g	merck 5886
2	gedestilleerd water	1 liter	

Los 1 op in 2.

Steriliseren in autoclaaf 45 min bij 120 °C.

Bereiding van DSW

Voor de bereiding van het DSW wordt van iedere oplossing 100 ml toegevoegd aan 50 liter demiwater.

Na een uur goed beluchten is het water gereed voor gebruik.

Opmerkingen

De evenwichts pH na beluchting is ca. 8,4. Dit medium kan desgewenst in grote hoeveelheden worden gemaakt. Het behoudt gedurende ca. 1 maand dezelfde samenstelling mits het goed wordt belucht.

Bereiding medium voor ELENdT water (M4):**Set I: Micronutriënten.**

Nr.:	Nr. WSCE:	Verbinding:	conc.in opl.:	Per liter:	per 350 liter
E1	W5	H ₃ BO ₃	5719 mg/l	0.50 ml	175.0 ml
E2	W13	MnCl ₂ * 4 H ₂ O	7210 mg/l	0.05 ml	17.5 ml
E3	G510	LiCl.	6120 mg/l	0.05 ml	17.5 ml
E4	5°Cel	RbCl	1420 mg/l	0.05 ml	17.5 ml
E5	G100	SrCl ₂ * 6 H ₂ O	3040 mg/l	0.05 ml	17.5 ml
E6	G193	NaBr	320 mg/l	0.05 ml	17.5 ml
E7	W107	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	1260 mg/l	0.05 ml	17.5 ml
E8	G65	CuCl ₂ * 2 H ₂ O	335 mg/l	0.05 ml	17.5 ml
E9	5°Cel	ZnCl ₂	260 mg/l	0.05 ml	17.5 ml
E10	W122	CoCl ₂ * 6 H ₂ O	200 mg/l	0.05 ml	17.5 ml
E11	W18	KJ	65 mg/l	0.05 ml	17.5 ml
E12	G513	Na ₂ SeO ₃	43.8 mg/l	0.05 ml	17.5 ml
E13	W11	NH ₄ VO ₃	11.5 mg/l	0.05 ml	17.5 ml

E14	W101	Na ₂ EDTA * 2H ₂ O	5000 mg/l	Bij elkaar voegen en autoclaveren (20 min. 121°C)	
	W4	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1991 mg/l		
gecombineerde Fe-oplossing.				1.0 ml	350 ml

Set II: Macronutriënten

E15	W31	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	235,2 gr / 2 liter	2.5 ml	875 ml
E16	W65	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	98,6 gr / 2 liter	2.5 ml	875 ml
E17	W60	KCl.	4,6 gr / 2 liter	2.5 ml	875 ml
E18	W26	NaHCO ₃	51,8 gr / 2 liter	2.5 ml	875 ml

Set III: Buffers.

E19	W41	Na ₂ SiO ₃ * 9 H ₂ O	10000 mg/l	1.0 ml	350 ml
E20	W24	NaNO ₃	2740 mg/l	0.1 ml	35 ml
E21	W60	KH ₂ PO ₄	1430 mg/l	0.1 ml	35 ml
E22	W26	K ₂ HPO ₄	1840 mg/l	0.1 ml	35 ml

E23	K 108	Thiamine (HCL)	750.0 mg	Bij elkaar in 1 liter	
	K 35	Cyanocobalamine (B ₁₂)	10.0 mg		
	K 33	Biotine	7.5 mg		
Gecombineerde vitamine-oplossing:				0.1 ml	35 ml

- w = weegkamer
- g = gifkast lab.
- 5° Cel = klimaatcel 115
- K = Koelkast Lab WSCE

Bewaar de vitamine-oplossing in kleine porties in de diepvries. Voeg de hoeveelheid vlak voor gebruik van het standaardwater toe. De oplossingen bewaren in donker bij 4 ± 2° C. Belucht het medium tenminste 1 uur voor gebruik. Na belichting ligt de pH tussen 7,5 en 8,5. De hardheid bedraagt ca. 250 mg/l als CaCO₃. Het water kan in grote hoeveelheden worden gemaakt. Het behoudt gedurende ca. 1 maand dezelfde samenstelling

Samenstelling van Phosphate Buffer Saline.

1 x PBS 1 liter: 8.00 g NaCl
0.20 g KCl
2.16 g Na₂HPO₄ · 7H₂O
0.20 g KH₂PO₄

Samenstelling van Daphniabuffer met BSA (DBSA)

De buffer bevat per liter:

NaCl	2.7353 gram	(46.75 mM)
KCl	0.0615 gram	(0.825 mM)
CaCl ₂	0.6959 gram	(6.27 mM)
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2237 gram	(1.1 mM)

Deze oplossing kan lang bij kamertemperatuur bewaard worden.

Voor gebruik wordt aan 100 ml buffer 0.5 ml 1M HEPES pH 7.4 en 100 mg Bovine Serum Albumine (BSA) toegevoegd. De buffer heeft een concentratie van 60 mM en een osmolaliteit van 132 mOsm/kg.

Samenstelling van de lysisbuffer voor de cometassay

Deze buffer wordt 's ochtends voor de test gemaakt en koel weggezet.

100 ml buffer bevat:

1% N-Lauroylsarcosine	(= 1 gram)
2.5 M NaCl	(= 14.63 gram)
0.1 M EDTA	(= 3.72 gram)
0.2 M Tris(hydroxymethyl)aminomethaan	(= 0.121 gram)

De pH wordt gesteld op 10 met natronloog (25% en 5%). Hierna wordt de buffer bij 4°C weggezet. Vlak voor gebruik wordt toegevoegd: 1.11 ml Triton-X-100 en 11.1 ml DMSO.

Samenstelling van de electroforesebuffer voor de cometassay

1.5 liter buffer bevat:

18 gram NaOH	(= 0.3 M)
5.58 EDTA (natriumzout)	(= 1 mM)

Deze buffer is lang houdbaar, wordt bij 4°C weggezet en pas vlak voor gebruik in de electroforesebak gegoten.