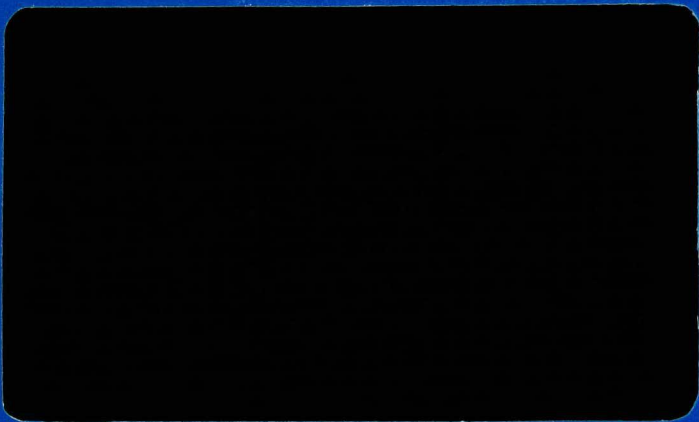


hoofdgroep
maatschappelijke technologie

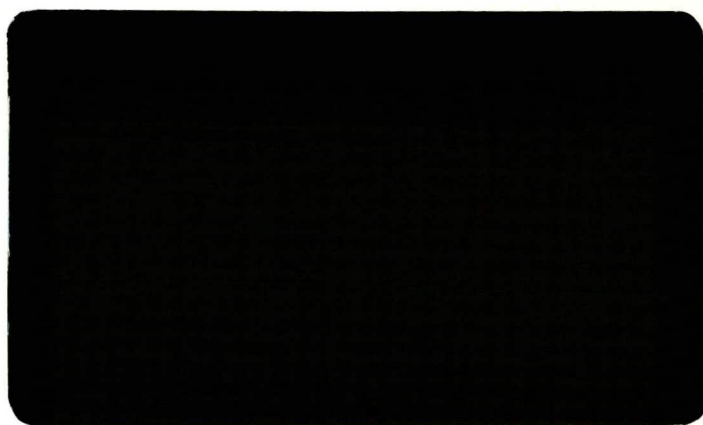
organisatie voor
toegepast-natuurwetenschappelijk
onderzoek

Dt: 123554

DIR. NOORDZEE	
FBI. Nr. 5751	100 I



TNO



**hoofdafdeling
maatschappelijke technologie**

organisatie voor
toegepast-natuurwetenschappelijk
onderzoek

RIJKSWATERSTAAT
DIRECTIE NOORDZEE
BIBLIOTHEEK
SIGNATUUR.: C 1971

Rapport nr. : MD-N&E 81/10 /MBL 1981-8
Opdracht nr. : 3640
Datum : 1981-07-22

ONDERZOEK NAAR DE GESCHIKTHEID VAN
EXTRACTEN VAN DE MOSSEL MYTILUS EDULIS
TER BEPALING VAN MUTAGENE ACTIVITEIT
DAARIN MET BEHULP VAN DE AMES-TOETS

Ir. G.J. Vink e.a.

nijverheidsorganisatie

TNO

postbus 217
2600 AE delft

bezoekadres
schoemakerstraat 97

telex 31453 zptno
telefoon 015 - 56 93 30

Auteurs:

Ir. G.J. Vink ¹⁾
Dr. I.E. Mattern ²⁾
W. van der Zwaan ²⁾
Th. J. van Veen ¹⁾

Opdrachtgever:

Rijkswaterstaat,
Directie Noordzee
Koopmansstraat 1
Rijswijk (ZH)

- 1) Hoofdgroep Maatschappelijke Technologie, TNO, Delft.
- 2) Medisch Biologisch Laboratorium, TNO, Delft.

„Voor de rechten en verplichtingen van de opdrachtgever met betrekking tot de inhoud van dit rapport wordt verwezen naar de Algemene Voorwaarden van TNO”.

Niets uit deze uitgave mag worden vervaelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotocopie, microfilm of op welke andere wijze ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van TNO. TNO aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid met betrekking tot de inhoud en/of de vorm van deze uitgave.

INHOUD

	blz.
SAMENVATTING	3
1. INLEIDING	4
2. MATERIAAL EN METHODEN	5
2.1 Herkomst van de mosselen	5
2.2 Extractiemethoden	5
2.3 Met benzo(a)pyreen- ³ H verrijkte mosselen	7
2.4 De Ames-toets	7
2.5 Maskering van mutagene activiteit door mosselextract	9
2.6 Bepaling van mutagene activiteit in watermonsters	9
3. RESULTATEN	10
3.1 Mosselmonsters uit het veld	10
3.2 Met benzo(a)pyreen verrijkte mosselextracten	13
3.3 Maskering van mutagene activiteit door mosselextract	15
3.4 Zeewatermonsters	20
4. DISCUSSIE	22
5. LITERATUUR	26

SAMENVATTING

Dit rapport beschrijft een onderzoek naar de mogelijkheden om in organische extracten van het weefsel van de mossel *Mytilus edulis* mutagene activiteit aan te tonen met behulp van de Salmonella (Ames)-toets.

Het onderzoek vormt een onderdeel van een project waarin ook de geschiktheid wordt bestudeerd van een biochemische methode en twee cytogenetische methoden voor het bepalen van mutagene activiteit in aquatische organismen.

Een tweetal extractiemethoden werd toegepast:

een alcohol- of DMSO-uitschudmethode voor mossel vleeshomogenaat, zonder concentrering van stoffen, en een aceton-soxhletextraktie-methode voor gevriesdroogd mossel vleeshomogenaat, met concentrering van stoffen tot ca 100 maal.

Alcohol- en DMSO-extracten van mosselen van verschillende lokaties langs de Nederlandse kust bleken grotendeels niet mutageen in de Ames-toets met stam TA 98 en TA 100, met en zonder toepassing van S9 ; in enkele gevallen werd een gering positief effect gemeten.

Van geconcentreerde aceton-extracten van met benzo(a)pyreen verrijkte mosselen kon niet de verwachte mutageniteit worden aangetoond. Dergelijke extracten, ook van niet met benzo(a)pyreen verrijkte mosselen, bleken een maskerende werking te vertonen op de mutageniteit van benzo(a)pyreen en van enige andere mutagene verbindingen.

Het feit dat deze anti-mutagene werking optrad voor direct- én indirect-werkende mutagenen geeft aan dat het effect niet (alleen) te wijten is aan inactivering van metaboliserende enzymen.

Zowel de alcohol c.q. DMSO- als de aceton-extractiemethode lijken niet geschikt voor het aantonen van mutagene activiteit in mosselen afkomstig van de Nederlandse kust.

Concentrering van stoffen direct uit zeewater op XAD-harsen vormt mogelijk een geschikt alternatief voor de monitoring van mutagene stoffen in marien milieu.

1. INLEIDING

Onderzoek naar de mutagene en genotoxische eigenschappen van chemicaliën heeft het laatste tiental jaren een enorme vlucht genomen. De voornaamste reden hiervan is dat stoffen met mutagene eigenschappen in vele gevallen effecten van carcinogene aard kunnen veroorzaken.

Door de snelle ontwikkelingen van de methodieken voor het bepalen van mutagene stoffen werd ook onderzoek naar het vóórkomen van deze stoffen in het milieu met behulp van kortdurende biologische toetssystemen mogelijk. Parry et.al. (1976) konden in eenvoudig verkregen alcohol-extracten van mosselmonsters van de Engelse zuidkust mutagene activiteit met de Ames-toets aantonen.

Deze mogelijkheid vormde aanleiding voor een onderzoek waarin de bruikbaarheid van deze methodiek voor de mossel *Mytilus edulis*, nader onderzocht werd.

Het onderzoek is omschreven als deelonderzoek in het voorstel RV 77/17 (CL-TNO), waarin ook onderzoek naar de geschiktheid van cytogenetische en biochemische methoden voor het bepalen van genotoxische effecten in aquatische organismen is omschreven.

Het onderzoek maakte deel uit van het projekt "Toxiciteit en Persistentie" II dat door Rijkswaterstaat, Directie Noordzee in uitvoering werd gegeven. Het doel van het onderhavige deelonderzoek is na te gaan of mosselen die, zoals uit meetnetstudies bekend is, in sterke mate stoffen uit hun omgeving kunnen ophopen, geschikte indicatororganismen zijn om met behulp van de Ames-toets mutagene stoffen in het marien milieu aan te tonen. Hiertoe zijn een tweetal extraktie-methoden voor mosselen toegepast: een alcohol-uitschudextraktie en een aceton-soxhletextraktie.

Het vóórkomen van mutagene aktiviteit van in het veld verzamelde monsters werd nagegaan, als ook de mutagene aktiviteit in mosselen die geëxposeerd waren aan een hoge concentratie benzo(a)pyreen (BaP) in water. De resultaten hiervan waren aanleiding tot verder onderzoek naar de invloed van mosselextrakt op mutagene aktiviteit van enige bekende genotoxische stoffen.

Tenslotte werd in een preliminair onderzoek mutagene aktiviteit bepaald in met XAD-kolommen verkregen extracten van monsters zeewater.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1 HERKOMST VAN DE MOSSELEN

Voor het onderzoek naar het vóórkomen van mutagene activiteit in de veld-situatie werden mosselen op verschillende plaatsen langs de Nederlandse kust verzameld, hetzij in de getijde-zone, of van boeien op enkele mijlen uit de kust.

Tijd en plaats van verzamelen en de afmetingen van de mosselen zijn in paragraaf 3 bij de beschrijving van de resultaten vermeld. De mosselen werden diepgevroren (-20°C) of direkt verwerkt voor de extractie.

De mosselen voor de experimenten met expositie aan BaP waren afkomstig uit de getijde-zone aan de dijk bij Huisduinen (Den Helder). Ze werden in het laboratorium in natuurlijk zeewater enkele dagen geacclimatiseerd bij $11-14^{\circ}\text{C}$; exemplaren van ca 5 cm lengte werden gebruikt voor expositieproeven.

2.2 EXTRAXTIEMETHODEN

Twee extractiemethoden zijn toegepast:

- a. een uitschudmethode met alcohol 96 % of met dimethylsulfoxide (DMSO) volgens Parry et.al (1976),
- b. een soxhletextractie met aceton van gevriesdroogd mossel vleeshomogenaat volgens Van Veen (1981).

Figuur 1 geeft de extractieprocedure voor beide methoden schematisch weer.

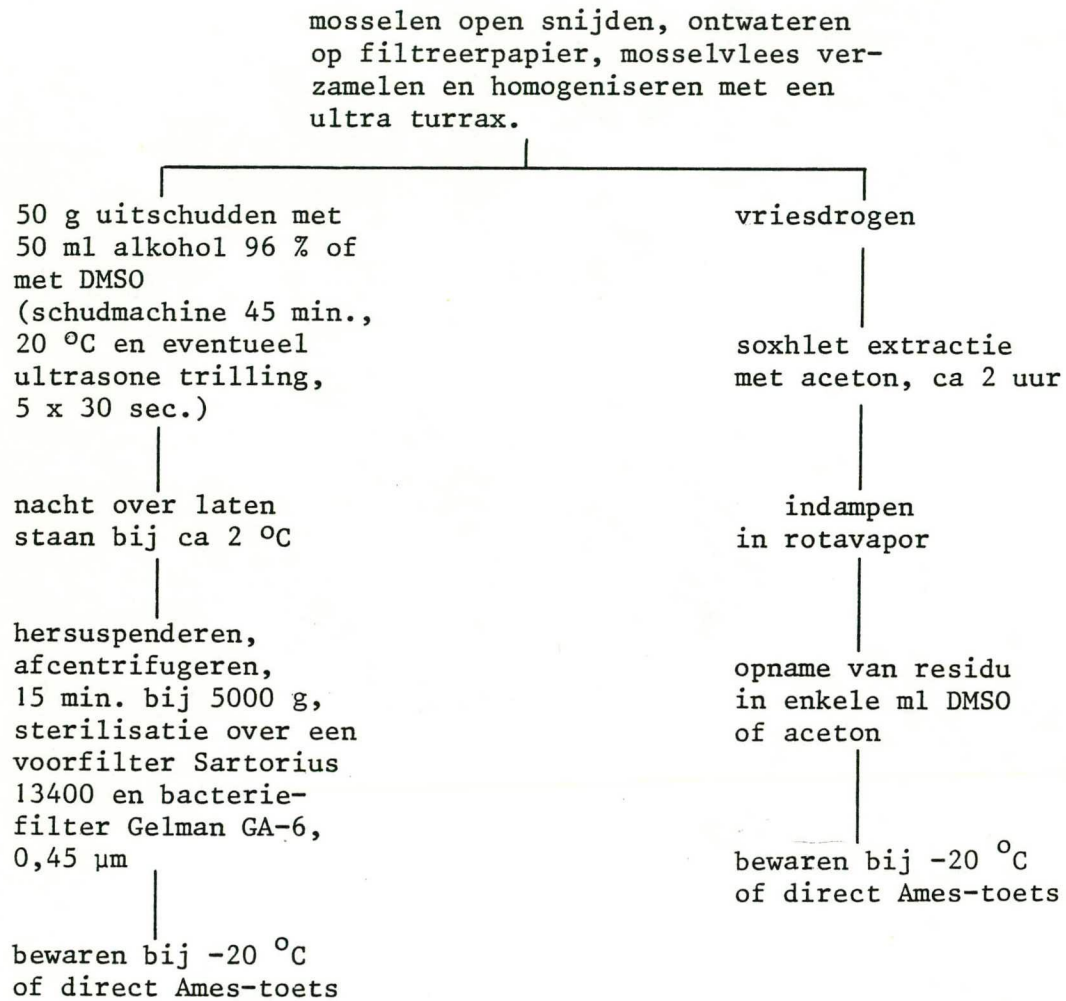


Fig. 1 Extractieschema voor mosselvlees
links: uitschudmethode met alcohol of DMSO
rechts: soxhletextractie met aceton van gevriesdroogd
mosselvlees.

2.3 MET BENZO(a)PYREEN - ^3H VERRIJKTE MOSSELEN

Voor het verkrijgen van mosselen met een voldoende hoog gehalte aan BaP- ^3H werd uitgegaan van de eerder door Van Veen (1980) vastgestelde gegevens over het accumulatiepatroon van deze stof. Hierbij zijn van belang de accumulatiefactor van ca 1500 en de korte expositieperiode van ca 2 uur waarbinnen het plateau in de accumulatiekromme wordt bereikt; verder is van belang de mate van verlies aan BaP- ^3H bij de aceton-soxhlet extractieprocedure (Van Veen, 1981).

Grote mosselen van ca 5 cm lengte werden geëxposeerd aan getritieerd BaP zodat, rekening houdend met voornoemde factoren, in het uiteindelijke mosselextract ongeveer 40 ug BaP- ^3H per ml aanwezig was. Na afdampen van de aceton werd het residu opgenomen in 2,5 ml DMSO. De concentratie BaP- ^3H , afgeleid uit de radioactiviteit gemeten in een vloeistofscintillatieteller, bedroeg 38 ug ml $^{-1}$ (Extract A).

Op een partij niet aan BaP geëxposeerde mosselen werd dezelfde extractieprocedure toegepast.

Het aceton-extract, waarvan de aceton grotendeels was afgedampt, werd in twee porties verdeeld; aan één portie werd (niet radioactief) BaP toegevoegd tot een concentratie van 40 ug ml $^{-1}$ in het uiteindelijke extract (Extract B); de andere portie kreeg geen toevoeging. Het restant aceton van beide porties werd afgedampt en de residuen werden opgenomen in DMSO, en als zodanig of na verdunning gebruikt in de Ames-toets.

De concentreringsfactor die met deze methode wordt bereikt bedraagt 75 à 100. Uitgaande van 150 g nat mossel vlees werd na vriesdrogen 25 g droog mossel vlees verkregen; het residu na extractie en afdampen bedroeg ongeveer 2 g.

2. DE AMES-TOETS

Met de Ames-toets wordt onderzocht of chemicaliën of mengsels daarvan in staat zijn mutaties te induceren bij bepaalde stammen van de bacterie *Salmonella typhimurium*. Deze stammen zijn door een mutatie niet meer in staat het voor hen essentiële aminozuur histidine zelf te synthetiseren. Door een terugmutatie kan het vermogen histidine te synthetiseren herwonnen worden; dit gebeurt spontaan; de frequentie wordt sterk verhoogd

door blootstelling aan diverse zogenoemde mutagene stoffen.

In een medium zonder histidine kunnen alleen de teruggemuteerde bacteriën uitgroeien tot telbare kolonies. Het aantal histidine-prototrofe kolonies is een maat voor het mutagene effect van de onderzochte stof.

Een aantal stoffen is zelf niet mutageen maar kan door het metabolisme van een organisme worden omgezet tot mutagene intermediaire- of eind-producten. Bacteriën missen echter de voor zoogdieren karakteristieke omzettingsmechanismen.

Om aan dit bezwaar tegemoet te komen worden in de Ames-toets weefsel-homogenaten van zoogdierorganen, meestal rattelever, toegevoegd aan het medium.

De procedure voor de Ames-toets is in detail beschreven door Ames et.al. (1975), en komt in het kort op het volgende neer.

Petrischalen worden voorzien van ongeveer 20 ml 1,5% Noble agar in 'Minimal Vogel Bonner Medium E', dat 2% glucose bevat. Hierop wordt 3 ml vloeibare topagar (0,6% agar, 0,5% NaCl, 0,05 mM histidine en 0,05 mM biotine) gebracht waarin wordt toegevoegd: 0,1 ml bacteriecultuur in nutrientbouillon met ca 1×10^9 bacteriën. ml⁻¹, 0,5 ml door Aroclor 1254 geïnduceerd leverhomogenaat (S9, alleen wanneer aangeduid), 0,025 - 0,5 ml van een bepaald mosselextract (of waterextract) of een verdunning daarvan, en/of een oplossing van een bekende mutagene stof.

De platen worden 2 à 3 dagen geïncubeerd bij 37 °C, waarna de kolonies worden geteld.

In dit onderzoek werden de bacteriestam TA 98 en TA 100 gebruikt, die respectievelijk gevoelig zijn voor stoffen die de zogenoemde frameshift-mutaties veroorzaken en voor stoffen die zowel frameshift- als basenpaar-substitutie-mutaties veroorzaken.*)

*) Een frameshiftmutatie is een mutatie waarbij één of meer baseparen uit het DNA zijn weggevallen of er aan zijn toegevoegd.
Een basenpaar-substitutie-mutatie is een mutatie waarbij een basenpaar van het DNA wordt vervangen door een ander basenpaar.

2.5 MASKERING VAN MUTAGENE ACTIVITEIT DOOR MOSSELEXTRACT

Naar aanleiding van negatieve resultaten van de meting van mutagene activiteit in met BaP-³H verrijkte mosselextracten werd de invloed van de mosselextracten op de mutagene activiteit van enige bekende genotoxische stoffen in de Ames-toets nader onderzocht. Deze stoffen werden gekozen op basis van verschillen in water- c.q. vet-oplosbaarheid en noodzaak van bio-activering voor mutagene werking:

ethidiumbromide	- in water oplosbaar, bio-activering nodig
nitrofurazon	- in water oplosbaar, geen bio-activering nodig
4-nitrochinoline oxide	- slecht in water oplosbaar, geen bio-activering nodig
benzo(a)pyreen	- slecht in water oplosbaar, bio-activering nodig

Met deze verbindingen werd de Ames-toets uitgevoerd conform 2.4 onder toevoeging van verschillende hoeveelheden mosselextract, en bij ethidiumbromide en BaP 0,5 ml ratteleverhomogenaat (S9).

2.6 BEPALING VAN MUTAGENE ACTIVITEIT IN WATERMONSTERS

Op drie locaties langs de Nederlandse kust werden, tegelijk met het verzamelen van mosselen van boeien, zeewatermonsters van elk 10-20 L verzameld.

Deze monsters werden door het Rijksinstituut voor Drinkwatervoorziening (Leidschendam) geconcentreerd door adsorptie op XAD-harsen en elutie met DMSO, volgens een methode die voor het Nederlandse rivierwater werd toegepast (Van Kreijl et.al., 1980; Kool et.al., 1981). De watermonsters worden hierbij eerst onder stikstofdruk gefiltreerd over een voorfilter en een membraanfilter met poriëngrootten van respectievelijk 8 en 0,45 µm.

Kolommen van 25 x 1,5 cm worden gevuld met 10 cm³ van een 1:1 mengsel van XAD-4 en XAD-8 en gespoeld met methanol, aceton en DMSO. Bij de concentrering lopen de watermonsters met een snelheid van 5-15 ml.min⁻¹ over de kolom bij 15 °C; de geabsorbeerde organische stoffen worden geëlueerd met een kleine hoeveelheid DMSO; dit wordt gesteriliseerd door filtratie over 0,2 µm-teflonfilters en direct met de Ames-toets onderzocht op mutagene activiteit of bewaard bij -20 °C.

3. RESULTATEN

3.1 MOSSELMONSTERS UIT HET VELD

De mutagene activiteit van DMSO- en alkoholextracten van monsters mosselen verzameld op drie locaties langs de Nederlandse kust in februari 1977, en bepaald met de bacteriestammen TA 98 en TA 100 in de Ames-toets is weergegeven in tabel 1.

Er is sprake van mutagene activiteit van de mosselextracten als het aantal histidine-prototrofe kolonies minimaal tweemaal die van de blanco is, en er een dosis-effectrelatie aanwezig is.

Hiervan uitgaande is in geen van de mosselextracten van de drie locaties mutagene activiteit aanwezig bij toetsing met de stammen TA 98 en TA 100, zonder toepassing van het metaboliserend systeem (S9).

Mét toepassing van S9 vertonen het alcohol- en het DMSO + u.s. extract van Hoek van Holland een twee tot drie-voudige verhoging met stam TA 98; er is echter geen dosis-effectrelatie. Bij stam TA 100 + S9 zijn er met de extracten van Hoek van Holland geen verschillen ten opzichte van de blanco. Met toepassing van S9 vertoont het DMSO-extract van het Penrod mosselmonster mutagene activiteit met stam TA 98 en TA 100; dit is niet het geval met het alkoholextract onder dezelfde toetscondities.

Het DMSO-extract van het mosselmonster van de Eems-Dollard vertoont een drie tot vier-voudige verhoogde mutagene activiteit met de stammen TA 98 en TA 100 onder toepassing van S9; in deze gevallen is er ook enigszins sprake van een dosis-effectrelatie; de overeenkomstige resultaten met het alkoholextract duiden niet op mutagene activiteit.

Monsterplaats	TA 98						TA 100			
	Extractie-middel	dosis ml/plaat	-S9 ¹⁾		+S9		-S9		+S9	
			\bar{x} 2)	v 3)	\bar{x}	v	\bar{x}	v	\bar{x}	v
Hoek van Holland	DMSO	blanko ⁴⁾	14	13	33	3	107	14	121	30
		0,10	27	14	34	14	133	10	148	36
		0,25	26	18	43	0	195	10	153	22
	DMSO + u.s. ⁵⁾	0,10	25	9	62	11	123	12	160	16
		0,25	27	6	79	24	128	7	162	12
	Alkohol	blanko	14	10	19	4	129	21	115	30
		0,10	24	10	53	13	139	13	155	39
		0,15	26	16	48	19	102	17	162	50
	Alkohol + u.s.	0,10	18	9	28	6	156	33	145	31
		0,15	29	12	48	26	152	52	131	6
Penrod boorlocatie (75 km noord-west Den Helder)	DMSO	0,10	12	2	130	12	134	30	(489)	302
		0,25	27	4	151	32	141	22	(414)	
	Alkohol	0,10	23	1	53	24	162	12	182	14
		0,15	20	2	48	8	150	6	159	13
Eems-Dollard	DMSO	blanko	37	24	66	12	114	17	122	29
		0,10	33	2	162	12	123	17	246	40
		0,25	42	12	281	40	167	12	299	18
	Alkohol	0,10	43	8	75	6	156	20	142	11
		0,15	43	10	108	7	149	30	191	40

Tabel 1. Mutagene activiteit van DMSO- en alkoholextracten van monsters mosselen, verzameld in februari 1977 op drie locaties langs de Nederlandse kust, bepaald met de bacterie-stammen TA 98 en TA 100 in de Ames-toets.

- 1) S9 : wel (+S9) of geen (-S9) toevoeging van ratteleverhomogenaat voor metabole activering in de Ames-toets.
- 2) \bar{x} : gemiddeld aantal histidine-prototrofe kolonies in drie petrischalen.
- 3) v : verschil in aantal kolonies tussen de petrischaal met het grootste en die met het kleinste aantal kolonies.
- 4) blanko: 0,25 ml DMSO of alkohol
- 5) u.s. : extractie bij ultrasone trilling, 5 x 30 sec.

Alkoholextracten van monsters mosselen die in april 1980 (tegelijkertijd met zeewatermonsters, zie 3.4) werden verzameld van boeien op drie locaties voor de Nederlandse kust bleken in alle gevallen niet mutageen te zijn in de Ames-toets met stam TA 98 of TA 100, met en zonder toepassing van metabole activering (Tabel 2).

Tabel 2a. TA 98

dosis (μ l/pl)	Hoek van Holland ¹⁾		Noordwijk ¹⁾		Den Helder ¹⁾		Den Helder ²⁾	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+Sg	-S9	+S9	-S9
0	44 \pm 6	46 \pm 6	43 \pm 3	46 \pm 3	65 \pm 1	47 \pm 8	60 \pm 2	45 \pm 1
100	62 \pm 2	67 \pm 5	58 \pm 10	63 \pm 9	75 \pm 7	65 \pm 2	91 \pm 17	66 \pm 4
200	72 \pm 3	67 \pm 6	52 \pm 2	50 \pm 5	94 \pm 8	66 \pm 5	95 \pm 1	71 \pm 7
300	70 \pm 1	65 \pm 4	64 \pm 4	59 \pm 5	95 \pm 11	73 \pm 8	107 \pm 6	85 \pm 3

Tabel 2b. TA 100

dosis (μ l/pl)	Hoek van Holland ¹⁾		Noordwijk ¹⁾		Den Helder ¹⁾		Den Helder ²⁾	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
0	124 \pm 2	152 \pm 9	134 \pm 4	130 \pm 5	167 \pm 13	154 \pm 10	139 \pm 1	157 \pm 2
100	147 \pm 3	147 \pm 5	164 \pm 16	138 \pm 5	195 \pm 27	149 \pm 12	157 \pm 2	152 \pm 18
200	176 \pm 8	159 \pm 6	173 \pm 2	134 \pm 8	175 \pm 9	152 \pm 8	162 \pm 5	180 \pm 12
300	157 \pm 6	131 \pm 22	181 \pm 9	151 \pm 13	179 \pm 8	154 \pm 16	186 \pm 26	129 \pm 29

Tabel 2. Mutagene activiteit van alkoholextracten van monsters mosselen verzameld in april 1980 van boeien op drie locaties voor de Nederlandse kust, bepaald met de bacteriestam TA 98 (tabel 2a) en met stam TA 100 (tabel 2b) en zonder toevoeging van S9 in de Ames-toets.

Het gemiddelde aantal histidine-prototrofe kolonies in drie petrischalen, en de standaarddeviatie, is weergegeven. Resultaten van het oplosmiddel alleen (100, 200 en 300 μ l) waren in dezelfde range als dosis 0.

1) mosselen ca 7 cm lengte

2) mosselen ca 3 cm lengte

3.2 MET BENZO(a)PYREEN VERRIJKTE MOSSELEXTRACTEN

De mutagene activiteit van met benzo(a)pyreen verrijkte mosselextracten, bepaald met bacteriestam TA 98 in de Ames-toets is weergegeven in Tabel 3a. Extract A geeft de resultaten van de mosselen waarin BaP- 3^H is geaccumuleerd, zodanig dat het extract $38 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ van deze stof bevat.

Extract B geeft de resultaten van de onbehandelde mosselen, maar waarbij aan het extract niet-radioactief BaP werd toegevoegd tot een concentratie gelijk aan die van Extract A.

De extracties werden uitgevoerd volgens de aceton-soxhletmethode na vriesdrogen van het mosselhomogenaat.

Tabel 3 b toont de resultaten van de controletoeetsing met stam TA 98 van het mosselextract van onbehandelde mosselen (zonder toevoeging van BaP) en van een BaP-oplossing in aceton.

Zowel extract A als extract B (tabel 3 a) vertonen geen mutagene activiteit zoals deze op grond van de aanwezige BaP verwacht mocht worden, namelijk overeenkomstig de mutagene activiteit van de aceton-oplossing van BaP met stam TA 98 + S9 (tabel 3 b).

Het experiment met extract B en de controletoeetsing werden herhaald met een ander mosselmonster uit Den Helder. De resultaten waren overeenkomstig die in Tabel 3.

Hieruit blijkt dat de mutageniteit van BaP niet meer te detekteren is met de Ames-toets wanneer mosselextract, verkregen met de aceton-soxhletextractiemethode, in het toetsmedium aanwezig is.

Tabel 3 a. Mutagene activiteit van benzo(a)pyreen (BaP) bevattende mossel-extracten, bepaald met bacteriestam TA 98 in Ames-toets

extract dosis ml/plaat	ug BaP per plaat	Extract A BaP- ³ H, geaccumuleerd				Extract B BaP toegevoegd			
		-S9		+S9		-S9		+S9	
		\bar{x}	v	\bar{x}	v	\bar{x}	v	\bar{x}	v
0	0	32	4	65	13	32	4	65	13
0,025	0,9	72		49	14	25		52	26
0,050	1,9	55		69	26	63		57	22
0,100	3,8	79		61	9	66		58	16
0,200	7,6	64		50	20	51		54	6

Extract A: mosselen werden geëxposeerd aan getritieerd BaP; mosselhomogenaat met geaccumuleerd BaP werd gevriesdroogd en geëxtraheerd met aceton in een soxhlet; na indampen opname van het residu in DMSO en toetsing in de Ames-toets.

Extract B: aan een mosselextract, verkregen als extract A, van niet aan BaP geëxposeerde mosselen, werden de aangegeven hoeveelheden niet radioactief gemerkte BaP toegevoegd.

Tabel 3 b. Controletoetsing. Mutagene activiteit van mosselextract van onbehandelde mosselen en van een oplossing van BaP in aceton, bepaald met de bacteriestam TA 98 in de Ames-toets

Mosselextract				BaP in aceton					
dosis ml/plaat	-S9		+S9		dosis ug/plaat	-S9		+S9	
	\bar{x}	v	\bar{x}	v		\bar{x}	v	\bar{x}	v
0	32	4	65	13	0	32	4	65	13
0,025	43		54	14					
0,050	44		82	38	2,5	45		236	56
0,100	114		107	50	5	45		415	211
0,200	58		93	11	10	42		735	141

Zie voor verklaring van S9, \bar{x} en v het onderschrift van tabel 1.

3.3 MASKERING VAN MUTAGENE ACTIVITEIT DOOR MOSSELEXTRACT

Om na te gaan of maskering van mutagene activiteit door mosselextract ook optreedt bij andere, bekende genotoxische, stoffen werd de invloed op ethidiumbromide (EB), nitrafurazon (NF) en 4 nitrochinoline-oxide (NQO) bepaald, stoffen die werden gekozen op grond van verschillen in water-oplosbaarheid en noodzaak van bio-activering.

Voor BaP en EB werd de invloed van verschillende hoeveelheden mosselextract bepaald.

De resultaten met deze stoffen zijn vermeld in fig. 2.

Uit fig. 2a blijkt dat de maskering van de mutagene activiteit van BaP totaal is bij 5-100 % mosselextract in het testmedium (100 % = 50 μ l). Zelfs bij 100-voudige verdunning van het mosselextract (1 % m.e.) is de maskering nog vrijwel volledig.

Uit fig. 2b.1 blijkt dat ook de mutagene activiteit van EB, opgelost in fysiologisch zout met onverdund mosselextract (50 μ l) volledig wordt gemaskeerd.

Uit fig. 2b.2 blijkt dat de mutagene activiteit van 1 μ g EB per plaat ook reeds vanaf 5 % mosselextract wordt gemaskeerd.

Wanneer geen EB wordt toegevoegd hebben verschillende hoeveelheden mosselextract (5 en 25 %) geen invloed op de spontane mutatiefrequentie.

Beide stoffen, BaP en EB, vertonen eenzelfde beeld van maskering van mutagene activiteit door mosselextract. Beide stoffen behoeven metabole activering voor mutagene activiteit; BaP is slecht in water oplosbaar, EB daarentegen goed, zodat de vet- c.q. wateroplosbaarheid van de stof geen rol lijkt te spelen bij de maskering.

Maskering van de mutagene activiteit van NF, opgelost in DMSO, was meetbaar bij de hoogste toegepaste dosis: 4 μ g per plaat; bij lagere doses werd geen verschil in effect gevonden door toediening van 50 μ l mosselextract (Fig. 2c).

De mutagene activiteit van NQO, in aceton, wordt door mosselextract duidelijk gemaskeerd (Fig. 2d). Het verschil in effect tussen 10 % en 100 % mosselextract is waarschijnlijk gering. De concentratie 1 μ g NQO per plaat is enigszins toxisch voor de gebruikte Salmonella stam, TA 100; 3 μ g per plaat is zeer toxisch.

Zowel NF als NQO zijn direct-werkende mutagene stoffen die geen metabole activering behoeven voor de inductie van mutaties. Maskering van mutagene activiteit door mosselextract is bij deze stoffen geringer dan bij de indirect-werkende stoffen BaP en EB.

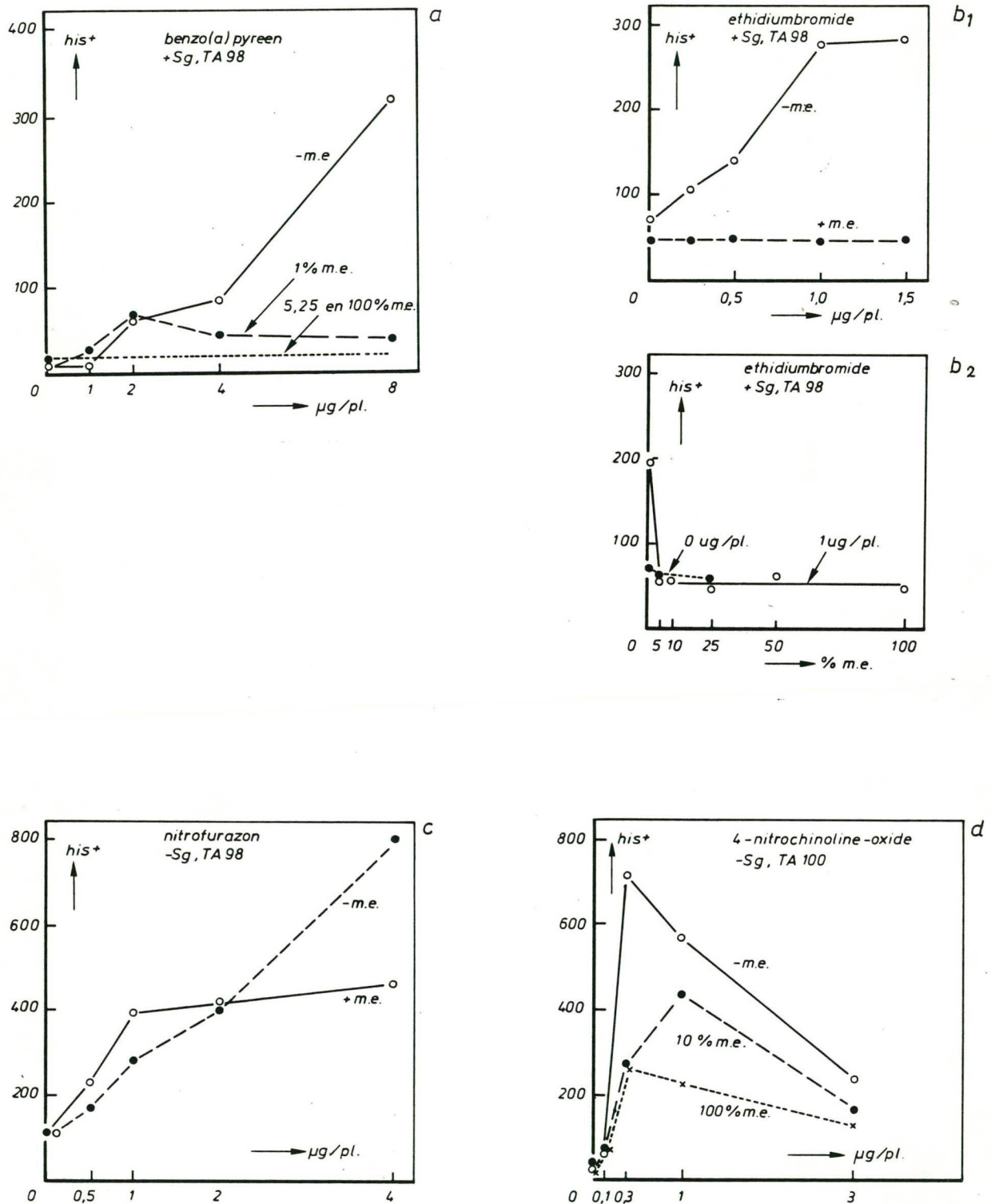


Fig. 2 Maskering van de mutagene activiteit van benzo(a)pyreen (fig. a), ethidiumbromide (fig. b), nitrofurazon (fig. c) en 4-nitrochinoline-oxide (fig. d) door mosselextract, verkregen door soxhletextractie met aceton van gevriesdroogd mosselvleeshomogenaat. De mutagene activiteit is bepaald met de Ames-toets met toepassing van stam TA 98, behalve voor 4-nitrochinoline-oxide, waarvoor stam TA 100 is gebruikt.

m.e. : mosselextract

his⁺ : gemiddeld aantal histidine prototrofe kolonies in drie petrischalen.

Samenvattend (Tabel 4) blijkt dat:

- de aanwezigheid van 75 tot 100 maal geconcentreerd mosselextract, verkregen met de aceton-soxhletmethode, in de Ames-assay een maskering van de mutagene activiteit van de vier bekende genotoxische stoffen veroorzaakt,
- de maskering van de mutageniteit het sterkst is bij de indirect-werkende stoffen, die metabole activering behoeven, zoals BaP en EB, ook nog na 20 tot 100 maal verdunnen van het extract, en veel minder sterk bij de direct-werkende stoffen NF en NQO,
- de wateroplosbaarheid c.q. de lipofiliteit geen belangrijke rol lijkt te spelen bij de maskering van mutagene activiteit door het mosselextract.

	bio-activering	wateroplos- baarheid	afname mutagene activiteit door mosselextract
benzo(a)pyreen	+	-	++
ethidiumbromide	+	+	++
nitrofurazon	-	+	+
4-nitrochinoline- oxide	-	-	+

Tabel 4. De eigenschappen van vier mutagene verbindingen ten aanzien van de noodzaak van bio-activering voor mutagene werking, en ten aanzien van de oplosbaarheid in water. Maskering van de mutagene activiteit van de vier verbindingen in de Ames-toets door de aanwezigheid van mosselextract, verkregen door soxhlet-extractie met aceton van gevriesdroogd mossel vleeshomogenaat.

Uit overeenkomstige proeven met, niet geconcentreerd alkoholextract van mosselen, verkregen volgens het extractieschema in fig. 1, blijkt dat dit extract geen maskering van mutagene activiteit van genotoxische stoffen veroorzaakt (Tabel 5).

In de 'discussie' wordt nader ingegaan op de mogelijke oorzaken van de maskering van mutagene activiteit c.q. antimutagene werking van stoffen.

	dosis µg/plaat	mosselextract	
		-	+
hycanthone	0	62 ± 5	74 ± 6
	6,25	476 ± 138	458 ± 10
	25	1112 ± 69	1007 ± 74
4-nitrochinoline-oxide	0	59 ± 14	63 ± 3
	0,3	267 ± 16	218 ± 31
	1,0	644 ± 22	577 ± 120
benzo(a)pyreen	0	85 ± 6	58 ± 2
	4	299 ± 57	371 ± 32
	8	485 ± 36	323 ± 36
ethidiumbromide	0	63 ± 4	68 ± 6
	0,5	277 ± 47	232 ± 47
	1,0	455 ± 88	443 ± 13

Tabel 5. Mutagene activiteit van hycanthone, 4-nitrochinoline-oxide (NQO), benzo(a)pyreen (BaP) en ethidiumbromide (EB) zonder en met toevoeging van 50 µl onverdund alkoholextract van 'schone' onbehandelde mosselen, bepaald met de bacteriestam TA 98 in de Ames-toets. Bij geen toevoeging van mosselextract werd 50 µl alcohol toegevoegd.
Het gemiddelde aantal histidine-prototrofe kolonies in drie petrischalen en de standaarddeviatie is weergegeven, zonder S9 voor hycanthone en NQO en met S9 voor BaP en EB.

3.4 ZEEWATERMONSTERS

De resultaten van een preliminair onderzoek naar de mutagene activiteit van DMSO-extracten van enkele monsters kustwater, verkregen door concentrering op XAD-harsen, en bepaald met de bacteriestammen TA 98 en TA 100 met en zonder toepassing van metabole activering (S9), zijn vermeld in tabel 6. Deze watermonsters zijn, tegelijk met de mosselmonsters (zie 3.1), verzameld in april 1980.

Bij concentrering met een factor 1100 tot 2000 bleek op alle locaties enige mutagene activiteit aanwezig.

De mutatiefrequentie was echter nergens met meer dan een factor 2 à 3 verhoogd. In de monsters van Hoek van Holland en Terheide werd effect gemeten met stam TA 98 + S9, in het monster van Noordwijk met stam TA 98 zowel +S9 als -S9 en in dat van Den Helder met stam TA 98 -S9.

Met stam 100 werd geen mutatie-inductie gemeten.

Monsterplaats ¹⁾ en Concentrerings- factor	dosis- ml/plaat	TA 98						TA 100					
		-S9			+S9			-S9			+S9		
		\bar{x}	v	m.a. ²⁾	\bar{x}	v	m.a.	\bar{x}	v	m.a.	\bar{x}	v	m.a.
Hoek van Holland 1200 x	blanko ³⁾	16	8		15	7		63	16		72	38	
	0,25	19	13	-	30	18	+	67	29	-	81	14	-
	0,50	18	3	-	46	25	+	55	2	-	73	17	-
Terheide 1100 x	blanko	20	11		25	5		92	42		100	21	
	0,25	27	12	-	30	8	-	87	20	-	83	21	-
	0,50	29	17	-	46	10	+	79	3	-	93	13	-
Noordwijk 2000 x	blanko	18	9		21	17							
	0,25	43	24	+	37	7	+						
	0,50	50	10	+	64	26	+						
Den Helder 2000 x	blanko	18	9		21	17							
	0,25	27	8	+	29	7	-						
	0,50	34	9	+	31	9	-						

Tabel 6. Mutagene activiteit van monsters kustwater na concentrering over XAD, bepaald met de bacteriestammen TA 98 en TA 100 in de Ames-toets.

- 1) De monsters werden verzameld in 1980 op:
 28/3 - Terheide
 11/4 - Hoek van Holland, monding Nieuwe Waterweg
 15/4 - Den Helder
 17/4 - Noordwijk

- 2) m.a.: mutagene activiteit: - niet mutageen
 + verdacht
 + mutageen

- 3) 0,25 ml dimethylsulfoxide.

Zie voor de verklaring van S9, \bar{x} en v het onderschrift bij tabel 1.

4. DISCUSSIE

Parry et.al. (1976) en Parry & Al-Mossawi (1979) hebben aangetoond dat alkoholextracten van mosselen, verzameld op bepaalde industrieel vervuilde locaties langs de Engelse zuidkust en de kust van Wales mutaties veroorzaken in de bacteriële vloeistof (fluctuatie-) en plaat toets met *Salmonella typhimurium* en *Escherichia coli*, en mitotische genconversie in de gist *Saccharomyces cerevisiae*. De effecten werden in alle gevallen gemeten zonder toepassing van een metabool activeringssysteem in de toetsmedia.

Frezza en Pegoraro (1980) vonden een verhoogde genconversie en mutatiefrequentie met gistcellen na 18 uur incubatie van de cellen in mosselen afkomstig uit een sterk vervuilde haven in de omgeving van Venetië ('host mediated assay' methode).

Met in-vitro-toetsen met gistcellen en *Salmonella* (Ames-toets) bleken organische extracten van dezelfde mosselmonsters echter negatief.

Sparks et.al. (1981) vonden met de *Salmonella* (Ames) toets geen mutagene effecten met oester-extract en geen tot marginaal mutagene effecten met een extract van zakpijpen (*Mogulla* sp.) en van garnalen (*Penaeus duorarum*), alle afkomstig uit wel en niet vervuilde estuariën van West-Florida.

Isopropanol werd gebruikt als extractiemiddel, geheel afgedampt en het residu werd in DMSO getoets na filtersterilisatie.

Alkoholextracten van mosselmonsters verzameld op verschillende plaatsen langs de Nederlandse kust en bereid volgens de methode van Parry bleken in ons onderzoek grotendeels negatief in de *Salmonella*-(Ames)toets; slechts in enkele gevallen werden enigszins verhoogde waarden gemeten, steeds met toepassing van het metabool activeringssysteem.

De resultaten van een beperkt aantal uitgevoerde fluctuatietoetsen met enkele mosselextracten waren steeds negatief (pers. meded. Mattern).

Dit kan betekenen dat de concentratie aan mutagene stoffen in het Nederlandse kustwater te laag is om met de toegepaste extractiemethode duidelijke effecten te kunnen meten. Opgemerkt moet worden dat bij de alcohol-extractiemethode van Parry geen sprake is van concentrering van (mutagene) stoffen; integendeel, de geëxtraheerde stoffen worden 1:1 verdund in een alcohol/water mengsel.

Toepassing van de soxhlet-extractiemethode met aceton van gelyophiliseerd mosselvlies, waarbij een concentreringsfactor van 75-100 werd bereikt, leverde geen enkel positief effect op in de Ames-toets.

Zelfs werden negatieve resultaten verkregen met extracten van mosselvlies waarin in vivo onder geforceerde omstandigheden een hoge concentratie van indirect mutageen werkende BaP was opgehoopt; dezelfde concentratie BaP gaf als oplossing in aceton wel de verwachte mutatie-inductie in de Ames-toets. Het is niet waarschijnlijk dat mosselen tijdens expositie het BaP omzetten in niet-mutagene metabolieten, daar de benodigde enzymen daartoe ontbreken of zeer geringe activiteit vertonen (Neff, 1979).

In het experiment met aan mosselextract toegevoegd BaP, kort voor de uitvoering van de Ames-toets, kon evenmin de mutagene activiteit van BaP worden aangetoond.

Maskering van mutagene activiteit door mosselextract, verkregen met de aceton-soxhletmethode, zoals deze gevonden werd voor BaP, bleek ook op te treden voor de drie bekende genotoxische modelstoffen NQO, EB en NF. Uit de resultaten blijkt dat de wateroplosbaarheid van de genoemde mutagene stoffen geen rol speelt bij de maskering van mutagene activiteit door mosselextract. De maskering is het sterkst bij de indirect mutageen werkende stoffen BaP en EB.

Als mogelijke oorzaken van de maskering zijn te noemen:

- remming van de bio-activerende enzymen in de S9
- stimulering van de inactiverende (conjugatie) enzymen in de S9
- 'wegvangen' c.q. insluiten van de mutagene stof
- veranderingen van de permeabiliteit van de bacterie-celwand
- invloed op de intracellulaire processen van mutatie-inductie en -fixatie.

Het is mogelijk dat in een mutageniteitstoets een interactie optreedt tussen verschillende stoffen, die kan leiden tot een verhoogde (co-) of een verlaagde (anti-) mutagene werking (Umezawa et.al., 1978; Kado et.al., 1978). Het werkingsmechanisme van de co- of anti-mutagene activiteit is meestal niet bekend, maar in een aantal gevallen is vastgesteld dat het metabolisme van de betreffende stof wordt beïnvloed (Ashby en Styles, 1978).

Uit het feit dat in ons onderzoek het verschijnsel van maskering ook optrad voor direct-werkende mutagenen (NQO en NF) blijkt dat het effect niet (alleen) te wijten is aan inactivering van metaboliserende enzymen.

Het 'wegvangen' van de stof of een verminderde penetratie in de cel onder invloed van het mosselextract is niet waarschijnlijk omdat dit een grotere invloed zou hebben bij de lagere concentraties van de mutagene stof, terwijl uit figuur 2 blijkt dat het anti-mutagene effect juist bij hogere concentraties het sterst is.

Om eventuele invloeden van mosselextract op de activiteit van metaboliserende enzymen, celpermeabiliteit en (externe) concentratie van het mutagene agens uit te sluiten, werd in een beperkt vervolg-onderzoek UV-straling als mutageen agens gebruikt. Nadat eerst geschikte UV-doses werden bepaald voor de stam TA 98, werd de inductie van histidine-prototrofe kolonies in aanwezigheid van mosselextract (en aceton als controle) onderzocht volgens de Ames-toets-procedure. Tot nu toe werd geen duidelijke en reproduceerbare remming van de mutatie-inductie door UV gevonden (wat er op zou wijzen dat de processen in de cel die het ontstaan van mutaties in het DNA leiden niet worden beïnvloed door (stoffen uit) het mosselextract). Het bleek echter moeilijk onder de gebruikte condities het aantal UV-geïnduceerde mutaties per overlevende bacterie kwantitatief nauwkeurig en reproduceerbaar te bepalen.

In ons onderzoek vertoonden niet geconcentreerde alkoholextracten van mosselen geen maskerende of anti-mutagene werking. Het is mogelijk dat een eventuele anti-mutagene factor in het alkoholextract in te lage concentratie voorkomt om tot uiting te komen; anderzijds kan niet worden uitgesloten dat juist de aceton-soxhletextractie-procedure verantwoordelijk is voor de maskering van mutagene activiteit van de onderzochte genotoxische stoffen.

Enkele positieve resultaten van een preliminair onderzoek naar de mutagene activiteit, in de Ames-toets, van DMSO-extracten van enkele monsters kustwater, verkregen door 1100 tot 2000-malige concentrering op XAD-harsen, wijzen erop dat deze methode mogelijk meer perspectieven biedt voor de monitoring van mutagene stoffen in marien milieu; nagegaan moet worden of hogere concentreringsfactoren duidelijker mutagene effecten geven; de methode levert echter geen informatie over de belasting van biota met genotoxische stoffen.

In de Nederlandse zoete wateren is de methode met succes toegepast (Van Kreijl et.al. 1980, Kool et.al. 1981). De verschillen in de concentreringsfactoren die nodig zijn om eenzelfde mutagene activiteit in zoetwater- en

in marien milieu aan te tonen wijzen erop dat de concentraties van deze stoffen in kustwater lager zijn dan in de Nederlandse wateren.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat het aantonen van mutagene activiteit in extracten van mosselen met behulp van de Ames-toets geen geschikte methode is voor de monitoring van Nederlands kustwater.

5. LITARATUUR

1. Ames, B.N., J. Mc Cann, E. Yamasaki (1975)
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/
mammalian microsome mutagenicity Test.
Mutation Res. 31: 347-364.
2. Ashby, J., J.A. Styles (1978)
Co-mutagenicity, competitive enzyme substrates and in vitro
carcinogenicity assays.
Mutation Res. 54: 102-112.
3. Frezza, D., B. Pegoraro (1980)
A host mediated assay with mussels: detection of mutagens in
marine water.
10th Ann. Meeting of EEMS on Env. Mutagens (Abstracts), Athens,
September 14-19, 1980.
4. Kado, T., K. Morita, T. Inoue (1978)
Antimutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic
principle of tryptophan pyrolysate.
Mutation Res. 53: 351-353.
5. Kool, H.J., C.F. van Kreijl, H.J. van Kranen en E. de Greef (1981)
The use of XAD-resins for the detection of mutagenic activity
in water. 1 Studies with surface water.
Chemosphere 10: 85-98.
6. Kreijl, C.F. van, H.J. Kool, M. de Vries, H.J. van Kranen en
E. de Greef (1980)
Mutagenic activity in the rivers Rhine and Meuse in the
Netherlands.
The Science of Total Environment 15: 137-147.
7. Neff, J.M. (1979)
Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment.
Applied Science Publishers, Ltd. London.
8. Parry, J.M., D.J. Tweats, M.A.J. Al-Mossawi (1976)
Monitoring the marine environment for mutagens.
Nature, Lond., 264: 538-540.
9. Parry, J.M., M.A.J. Al-Mossawi (1979)
The detection of mutagenic chemicals in the tissue of the mussel
Mytilus edulis.
Environ. Pollut. 19: 175-186.
10. Sparks, T.H., J.R. Baylis, C.W.J. Chang (1981)
Comparison of mutagen accumulation in three estuarine species
using the Salmonella/microsome activation system.
Mutation Res. 85: 133-139.

11. Umezawa, K., A. Shirai, T. Matsushima, T. Sugimura (1978)
Co-mutagenic effects of norharman and harman with
2-acetylamino fluorene derivatives.
Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 928-930.
12. Veen, Th.J. van (1980)
De accumulatie en eliminatie van met radioactiviteit gemerkt
benzo(a)pyreen bij mosselen (*Mytilus edulis*).
Rapport MT-TNO, MD-N&E 80/17.
13. Veen, Th.J. van (1981)
De extractie van in mosselen (*Mytilus edulis*) geaccumuleerd
benzo(a)pyreen-³H.
Rapport MT-TNO, MD-N&E 81/6.

