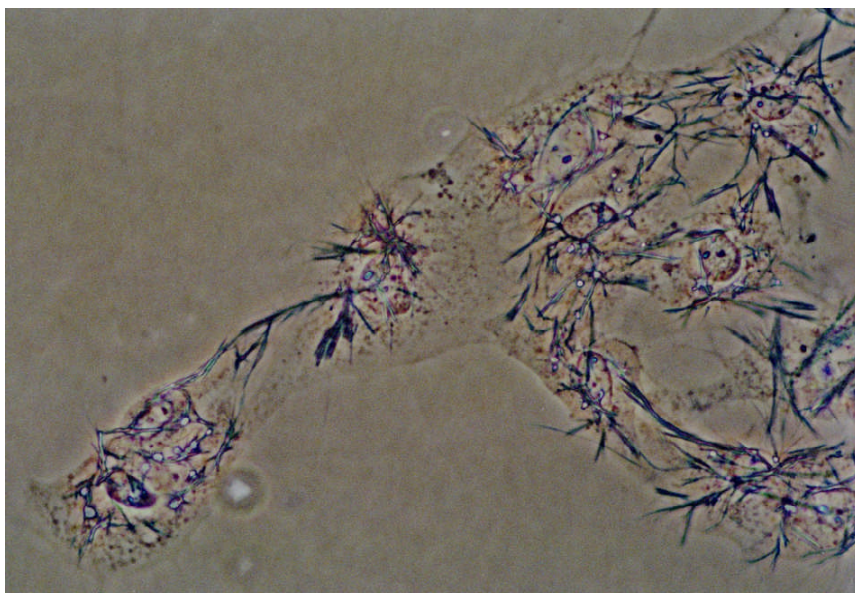




## **Toepassing van vis cellijnen bij de beoordeling van de toxiciteit van stoffen en effluenten**



**Auteurs:** Kees Tuk  
Piet den Besten  
**Werkdocumentnr:** 2001.055X  
**Datum:** maart 2001





### Samenvatting

Bioassays met vissen worden veel gebruikt bij de beoordeling van stoffen, industriële effluenten en verontreinigde oppervlaktewateren. Ook bij het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterverwerking (RIZA) wordt gebruikt gemaakt van gestandaardiseerde testen met Guppy's (*Poecilia reticulata*) en eieren van Zebravissen (*Brachydanio rerio*). Sterfte van de gebruikte organismen is bijna altijd het testcriterium. Het Platform Alternatieven voor Dierproeven (PAD) subsidieert de ontwikkeling van onderzoeksmethoden die leiden tot vervanging, vermindering of verfijning van het proefdiergebruik. Het PAD heeft een subsidie toegekend voor een project waarin de mogelijkheden van het gebruik van vis cellijnen ter vervanging van testen met vissen wordt onderzocht.

Het doel van het project waarover hier wordt gerapporteerd is om na te gaan of effectmetingen met vis cellijnen kunnen dienen als prescreening of dat deze testen de klassieke testen met vissen kunnen gaan vervangen.

Voor deze studie zijn een aantal vis cellijnen gebruikt afkomstig uit Regenboogforel (RTH-149, RTG-2) en Zebravis (ZF-4). Deze lijnen zijn in cytotoxiciteitstesten blootgesteld aan een 8-tal stoffen met een verschillend toxisch werkingsmechanisme: Cadmium, dichromaat, tributyltin chloride, 4-nitroquinoline-1-oxide, 3,4-dichlooraniline, ethylparathion, pentachloorbenzeen en benzo[a]pyreen. Daarnaast zijn een 18-tal effluenten, die ook bij het RIZA zijn getest met Guppy's ook met de cellijn RTH-149 getest. Ook zijn een 8-tal oppervlaktewaterconcentraten getest. De toxiciteit van de stoffen, de effluenten en de concentraten voor de cellijnen werd bepaald met een aantal eindpuntsbepalingen na 3 dagen blootstelling: de kristalvioletkleuring, de neutraalrood kleuring en de MTT kleuring.

De EC-10 en EC-50 waarden van de cytotoxiciteitsmetingen liggen voor een aantal stoffen in dezelfde orde grootte als de LC-50 voor Guppy. Pentachloorbenzeen en parathion zijn voor Guppy's veel toxischer (meer dan 1000x) dan voor de cellijnen. Voor 4-NQO en benzo[a]pyreen ligt het net andersom: deze stoffen zijn voor de cellijnen veel toxischer dan voor Guppy's.

De gevoeligheden van de cellijnen verschillen onderling per stof al liggen de concentraties van de EC-10 waarden ongeveer in dezelfde orde grootte. Uit het onderzoek blijkt dat de cellijn RTH-149 de gevoeligste van de drie is met de kristalvioletkleuring als gevoeligste kleuring. Deze cellijn blijkt ook gevoelig voor benzo[a]pyreen, wat op basis van de gepubliceerde literatuur niet te verwachten was.

Voor de beoordeling van stoffen met een heel specifiek toxische werking moet de keuze van de cellijn afhankelijk zijn van het aangrijpingspunt van de stof.

Voorals instrument voor de prescreening van effluenten voordat Guppytesten worden uitgevoerd lijken vis cellijnen goed bruikbaar. Echter, bepaalde effluenten blijken een nog onverklaard effect in de neutraalroodkleuring te veroorzaken en blijken in de overige kleuringen een lagere toxiciteit te hebben dan op basis van de LC-50 voor Guppy's verwacht mag worden. Afgezien van deze effluenten is de correlatie tussen de LC-50 van de Guppytest en bijvoorbeeld de EC-10 in de celkleuringen goed.

Ook zijn een aantal oppervlaktewaterconcentraten van Rijn en Maas getest met de RTH-149 cellijn. Er is niet zo'n goede correlatie tussen de gevonden EC-10 concentratie met RTH-149 en de bekende LC-50 waarden voor *Daphnia magna*. De gebruikte concentraten waren echter vrij oud. Herhaling van de experimenten met concentraten van recentere datum is aan te bevelen voordat iets over de bruikbaarheid van cellijnen bij de beoordeling van oppervlaktewaters geconcludeerd kan worden.



### Inhoud:

1	Inleiding	5
1.1	Algemeen	5
1.2	Projectbeschrijving	7
2	Materiaal en methoden	9
2.1	Beschrijving van de cellijnen	9
2.2	Kweek van de 3 cellijnen	9
2.3	Inzetten van de cytotoxiciteitstesten	11
2.3.1	Stoftesten	11
2.3.2	Testen van de effluenten	11
2.3.3	Testen van de oppervlaktewaterconcentraten	11
2.4	Uitvoering van de kristalvioletkleuring	12
2.5	Uitvoering van de neutraalroodkleuring	12
2.6	Uitvoering van de MTT kleuring	12
2.7	Berekening van de toxiciteit van de uitgeteste stoffen, effluenten en oppervlaktewaterconcentraten	13
3	Resultaten	15
3.1	Stoftesten	15
3.2	Resultaten van de testen met effluenten	22
3.3	Resultaten van de testen met oppervlaktewaterconcentraten	26
4	Discussie	29
5	Literatuur	33
6	Bijlagen	35
6.1	Gegevens en gemeten toxiciteitsparameters van de 8 stoffen met de drie cellijnen	35
6.2	Geleidbaarheid van de effluenten	43

## 1 Inleiding:

### 1.1 Algemeen

Bij de beoordeling van de ecotoxicologische risico's van industriële effluënten en verontreinigingen van de Nederlandse oppervlaktewateren bij calamiteiten wordt op het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterverwerking (RIZA) gebruik gemaakt van een aantal bioassays. De aanwezigheid van toxiciteit voor aquatische organismen wordt bij het RIZA, alsmede bij andere onderzoeksinstituten en adviesburo's, bepaald met gebruik van gestandaardiseerde testen met Watervlooien (*Daphnia magna*), Guppy's (*Poecilia reticulata*) en eieren van Zebravissen (*Brachydanio rerio*). Sterfte van de betrokken organismen is bijna altijd het testcriterium.

Ook bij het testen van de risico's van nieuwe producten voor het aquatisch milieu wordt gebruik gemaakt van deze testen.

De ontwikkeling van methoden om cellijnen te kweken van verschillende organismen heeft het mogelijk gemaakt om met verschillende in vitro testen de toxiciteit van stoffen voor organismen te schatten op basis van effecten van deze stoffen op kweken van deze cellen.

Op het gebied van medische biologie is hier al veel ervaring mee opgedaan. Het gebruik van celkweken heeft hier veel bijgedragen aan het verzamelen van kennis over pathologische processen, oncologie, celbiologie en immunologie. Maar ook bij het testen van farmaceutica en het onderzoek naar werkingsmechanismen van deze stoffen werd en wordt veel gebruik gemaakt van cellijnen.

Het gebruik van soortgelijke technieken voor de beoordeling van de van de effecten van stoffen en milieumonsters op celkweken van aquatische organismen is tot nu toe nog weinig gebruikt. Er zijn echter verschillende cellijnen van vissen te verkrijgen die hiervoor gebruikt zouden kunnen worden. Het doel van dit project is om na te gaan of effectmetingen met vis cellijnen kunnen dienen als prescreening of dat deze testen de klassieke testen met vissen zelfs kunnen gaan vervangen.

In de afgelopen 30 jaar zijn er een aantal vis cellijnen ontwikkeld (Lannan 1984), maar ook isolatie- en kweekmethoden van primaire celkweken van vissen die gebruikt worden voor toxicologisch en celbiologisch onderzoek aan aquatische organismen (Baksi 1990, Pesonen 1997, Gagné 1997). Hoewel de discussie over de bruikbaarheid van cellijnen voor biologisch onderzoek aan met name de cellulaire reactie van organismen op prikkels van allerlei aard (fysiologisch, celbiologisch, biochemisch) nog gaande is zou de ontwikkeling van in vitro testen ter bepaling van de toxiciteit van stoffen en milieumonsters wenselijk zijn en het gebruik van proefdieren op dit gebied kunnen terugdringen. Babich en Borenfreund hebben veel onderzoek gedaan naar de bruikbaarheid van vis cellijnen voor toxicologisch onderzoek. (review: Babich 1991). Zij concludeerden dat cellijnen als RTG-2, FHM en BE-2 gebruikt kunnen worden in de oriënterende testen van stoffen naar hun toxiciteit en genotoxiciteit voor aquatische biota. Ook kunnen toxiciteitsassays met vis cellijnen gebruikt worden om potentiële synergistische en antagonistische interacties tussen combinaties van stoffen te evalueren. Echter, de in vitro toxiciteit correleert niet altijd met de in vivo toxiciteit, zoals bij verschillende pesticiden bijvoorbeeld. Verder onderzoek is dus gewenst, stelden zij. Na een vrij actieve periode, waarin veel is gepubliceerd over onderzoek naar de bruikbaarheid van cellijnen als (gedeeltelijke) vervanging van testen met organismen (Sauvant 1997, Babich 1990, 1991, Lenz 1993, Huuskonen 1998) is het al enige tijd stil op dit gebied. Een duidelijke reden hiervoor is niet aan te wijzen. Uit deze gepubliceerde data kon over het algemeen geconcludeerd worden dat cellijnen van vis, mits op de juiste wijze gebruikt, veel informatie kunnen geven over de toxiciteit van stoffen. Het grootste verschil tussen vis cellijnen en vissen bleek bij zeer specifieke toxische stoffen op te treden zoals insecticiden (Babich 1991). Ook in recentere publicaties is de bruikbaarheid van vis cellijnen aangetoond. Huuskonen

(1998) en Hollert (2000) gebruikten vis cellijnen om de toxische effecten van extracten van waterbodems te onderzoeken.

Nu de maatschappelijke weerstand tegen het gebruik van gewervelde dieren voor het testen van lethale doses van stoffen langzaam aan het toenemen is, zou een heroverweging van de bruikbaarheid van in vitro testen nuttig kunnen zijn.

Er zijn eind tachtiger jaren en begin negentiger jaren een aantal publicaties verschenen over het gebruik van primaire vis-hepatocytenkweken voor biologisch onderzoek. Zie hier voor reviews Baksi (1990) en Pesonen (1997). Veel van het hierin beschreven onderzoek gaat over metabolisme en toxicologie. Het nadeel van het gebruik van primaire celkweken is echter dat de beschikbaarheid van deze cellen beperkt is en afhankelijk van de aanvoer van proefdieren voor het isoleren van de hepatocyten. Als er alleen gekeken wordt naar de toxicologische risico's van stoffen voor cellen (eventueel gevolgd door een test op organismen) zou in veel gevallen kunnen worden volstaan met geïmmortaliseerde cellijnen. Probleem is echter, dat in veel cellijnen bepaalde functies (zoals metabole omzetting van opgenomen stoffen) geheel of gedeeltelijk ontbreken of niet optimaal werken. Voor stoffen die niet gemetaboliseerd hoeven te worden om hun toxisch effect te bewerkstelligen is dit sowieso geen belemmering. Bovendien zijn in sommige cellijnen de toxicologisch relevante enzymsystemen die voor de metabole omzetting van toxicanten zorg dragen intact (Villeneuve 1997, Pollenz 1998). Het doel van dit project is het aanpassen van bestaande in vitro bioassays en eventueel ontwikkelen van nieuwe assays voor de bepaling van cytotoxiciteit in kweken van verschillende vis cellijnen na blootstelling aan met name industriële effluenten. Deze in vitro bioassays zouden dan gebruikt kunnen worden als prescreening om effluenten op te sporen die mogelijk toxisch zouden kunnen zijn voor de gebruikte organismen. Om als zo'n prescreening instrument te kunnen dienen moeten de ontwikkelde testen minstens even gevoelig of mogelijk gevoeliger zijn als de in vivo bioassay. Gagné (1997) heeft onderzoek gedaan naar de bruikbaarheid van primaire kweken van regenboogforel hepatocyten voor ecotoxicologische testen van effluenten. Er werd gekeken naar celdood, mixed function oxidase (MFO) activiteit, metallothioneïne inductie en genotoxiciteit. Er werd een goede correlatie gevonden tussen het hepatocytenmodel en een regenboogforel bioassay. De hepatocyten reageerden in 7-33 % van de testen gevoeliger dan de forellen. Het gebruik van cellijnen voor het schatten van ecotoxicologische risico's is ook beschreven door Sauvant (1997), al werd hier een muizen fibroblastenlijn (L929) gebruikt. Ook hier werd een vrij goede correlatie gevonden tussen de in vivo toxicologische data en de gevonden EC50 waarden met verschillende eindpuntsbepalingen.

Doel van het hier beschreven project is het testen van de bruikbaarheid van goed gestabiliseerde cellijnen van vissen om de toxiciteit van stoffen en effluenten voor vissen te voorspellen.

Voor dit project zijn een aantal cellijnen aangeschaft: RTH-149 ( een regenboogforelhepatomaliijn), RTG-2 (een regenboogforelgonaden cellijn) en ZF-4 ( een embryonale lijn van de zebravis). Helaas was er geen cellijn beschikbaar van Guppy verkrijgbaar.

Met deze 3 cellijnen werd de bruikbaarheid van een aantal cytotoxiciteitsbepalingen getest. Hierna werd van een 8-tal stoffen met verschillend werkingsmechanismen de toxiciteit bepaald met behulp van deze bepalingen.

Tenslotte werd een onderzoek uitgevoerd om de respons in de in vitro testen te vergelijken met de resultaten van de klassieke toxiciteitstest met guppy's. Hiertoe werden 18 effluenten en 8 oppervlaktewatermonsters getest.



### 1.2 Projectbeschrijving:

Het project is in twee fases uitgevoerd:

1. Operationaliseren en optimaliseren van de gekozen in vitro eindpunt assays met de drie cellijnen. Vervolgens bepaling van toxiciteit van een 8 tal stoffen met verschillende toxische werkingsmechanismen voor de drie cellijnen.
2. Vergelijking van de in vitro assays met de gebruikte vis testen bij de beoordeling van een aantal industriële effluenten en oppervlaktewatermonsters.

#### Fase 1:

De eindpuntassays die werden gekozen zijn:

1. Kristalvioletkleuring (Halder 1990). Met deze kleuring, die in feite alle eiwitten kleurt, worden alle na de blootstelling nog aanwezige adherente cellen gekleurd. In geval van een klein toxisch effect zal de kleuring een vermindering van de groei van een cellijn detecteren of een vermindering van de hoeveelheid eiwit per cel. Bij een groter toxisch effect zal de kleuring vooral een sterke relatie vertonen met de hoeveelheid overlevende cellen.
2. Neutraalroodopname test (Borenfreud 1985). In deze test wordt aan de cellen, na blootstelling, neutraalrood toegevoegd. Deze kleurstof accumuleert in de zure celcompartimenten. Dat zijn vooral de lysosomen. Dan moet echter wel de pH in deze lysosomen laag zijn. Als door een toxisch effect de protonenpompen in de membranen van de lysosomen uitvallen of verminderd actief zijn, zullen de cellen minder neutraalrood opnemen. Na opname van het neutraalrood wordt uiteindelijk de door de cellen opgenomen kleurstof geëxtraheerd en spectrofotometrisch bepaald. Een vermindering van de hoeveelheid neutraalrood kan bij een klein toxisch effect door een verlaagde opname door de lysosomen komen. Bij een groter toxisch effect is er vooral een relatie met de hoeveelheid levende cellen.
3. MTT kleuring (Mossman 1983). MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) is een stof die vooral door de mitochondriale succinaat dehydrogenases in levende cellen wordt omgezet in de kleurstof formazan. Dit formazan is onoplosbaar in water en kan na wegwassen van de overmaat MTT worden opgelost in DMSO en spectrofotometrisch worden bepaald. Hoewel deze test dus primair de activiteit van succinaatdehydrogenases aantoont is het bij het optreden van celdood vooral een vitaliteitskleuring.

Deze drie kleuringen zijn al eens gebruikt bij het bepalen van de cytotoxiciteit van stoffen op cellijnen van zoogdieren en vissen (Sauvant 1997, Lenz 1992, Babich 1991, Hollert 2000, Halder 1990).

Bij de keuze van de 8 stoffen waarvan de toxiciteit voor de drie cellijnen werd bepaald, is een zo groot mogelijk spectrum van toxische werkingsmechanismen in gedachten gehouden. Uiteindelijk zijn de volgende 8 stoffen gekozen:

1. Cadmium toegevoegd als  $\text{CdCl}_2$  als vertegenwoordiger van de groep van zware metalen.
2. Dichromaat toegevoegd als  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ . Het chroom in deze stof als zeswaardig ion vertegenwoordigt hier de meest toxische vorm van dit metaal.
3. Tributyltinchloride (TbT-Cl). Dit is een stof met een duidelijk specifiek toxische werking. De exacte toxische werking op cellulair niveau is niet bekend. Men gaat er vanuit dat de stof onder andere de lysosomen van gevoelige cellen beschadigt.



4. 4-nitroquinoline 1 oxide (4-NQO). Dit is een genotoxische stof. Een stof dus die het genoom van een cel beschadigt. De cytotoxische werking van de stof zal vooral te herleiden zijn tot het directe resultaat van deze beschadigingen op de 'fitness' van de cel.
5. 3,4-dichlooraniline. Deze stof is gekozen als vertegenwoordiger van de polair narcotiserende stoffen. Deze stoffen vertonen, naast de narcotiserende werking die een groot deel van hun toxiciteit verklaart bij een bepaalde lichaamsconcentratie nog een extra toxiciteit. Men verklaart deze extra toxiciteit door het optreden van interacties van de 'polaire substituties' in de moleculen van deze stoffen met targets in het lichaam (Roex 2000).
6. Pentachloorbenzeen. Deze stof is gekozen als vertegenwoordiger van de narcotiserende stoffen. Omdat bij de blootstelling van cellijnen aan de stoffen gebruik wordt gemaakt van een open systeem, moest worden gekozen voor een narcotiserende stof met een lage vluchtigheid. Hoewel dit bijna automatisch een lage oplosbaarheid betekent is gekozen voor pentachloorbenzeen.
7. Ethylparathion. Dit is een stof die vooral toxisch is door specifieke remming van het enzym acetylcholine esterase. Remming van dit enzym zorgt voor ophoping van acetylcholine in de synaptische spleet van de zenuwuiteinden en dientengevolge voor verstoring van de zenuwimpulsoverdracht. De cellijnen die in dit project worden gebruikt zijn geen van allen afhankelijk van een goede werking van acetylcholine esterase, als ze het al produceren. Verwacht werd dan ook dat deze stof vooral narcotiserend zou werken.
8. Benzo[a]pyreen (B[a]P), is een polyaromatische koolwaterstof (PAK), die via verschillende werkingsmechanismen toxisch is. Voor één of meerdere van deze mechanismen moet de stof wel eerst worden gemetaboliseerd. Volgens Babich (1989) bevat RTH-149 geen cytochroom P-450 activiteit en is B[a]P niet toxisch voor deze cellijn. Van RTG-2 is bekend dat deze lijn wel cytochroom P-450 activiteit bezit en B[a]P omzet in toxische metabolieten (Smolarek, 1987 en Thornton 1982). Van ZF-4 is niets hierover bekend.

### Fase 2:

Voor de vergelijking van de in vitro assays met de gebruikte vistesten en de daphniatesten zijn 18 effluenten en 8 oppervlaktewaterconcentraten verzameld en getest. Van deze monsters was de LC-50 voor Guppy en *Daphnia magna* (effluenten) of de LC-50 voor *Daphnia magna* (opp. waterconcentraten) al bepaald.

## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Beschrijving van de cellijnen:

Bij de keuze van de cellijnen is rekening gehouden met de vissoort waar de lijnen oorspronkelijk uit werden gekweekt. Deze keuze werd echter beperkt door de commerciële verkrijgbaarheid van de cellijnen. Er zijn eigenlijk maar 2 leveranciers van cellijnen die ook een redelijk assortiment hebben van andere lijnen dan humaan, rat en muis: ATCC in de VS en de ECACC in de UK. Helaas hebben deze firma's geen lijnen van Guppy's, de vissoort die bij het RIZA het meest gebruikt wordt als test species bij effluentbeoordeling.

Uit de lijnen die deze firma's aanbieden zijn 3 lijnen gekozen. 2 lijnen zijn afkomstig van de Regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*). De andere lijn van de Zebravis (*Brachydanio rerio*). De namen van de drie lijnen zijn:

1. RTG-2 (ATCC nr. CCL-55) is een cellijn afkomstig uit een celkweek van gepoold gonadenweefsel van mannelijke en vrouwelijke regenboogforellen en geïsoleerd door K. Wolf en M.C. Quimby in 1960. De lijn werd oorspronkelijk gekweekt in minimum essential medium met Eagle's zouten (MEM-Eagle), 10% humaan serum en antibiotica. Later werd overgegaan op MEM-Eagle met 10% foetaal runderserum (FBS) met niet essentiële aminozuren en natriumpyruvaat als extra toevoeging. De lijn heeft een fibroblastair uiterlijk.
2. RTH-149 (ATCC nr CRL-1710) is een cellijn die gekweekt werd uit een door aflatoxine geïnduceerde levertumor in regenboogforel in 1963 door J.L. Fryer. De lijn werd gekweekt in MEM-Eagle met niet essentiële aminozuren, natriumpyruvaat en 10% FBS. De lijn heeft een epitheliaal uiterlijk, echter niet duidelijk gedifferentieerd.
3. ZF-4 (ATCC CRL-2050) is een cellijn die in 1989 door W. Driever en Z. Rangini uit embryo's van zebravissen werd geïsoleerd en gekweekt. Het is een lijn met een fibroblastair uiterlijk. De lijn werd gekweekt in een 1:1 mengsel van Ham's F12 medium en Dulbecco's modified Eagle's medium met 10% FBS.

### 2.2 Kweek van de 3 cellijnen:

De cellijnen werden na het ontdooien uit de ampullen waarin ze werden geleverd in kweek gezet in de media die hierboven werden beschreven. Deze media worden gebruikt in een atmosfeer met 5% CO<sub>2</sub>. Deze atmosfeer kan op het kweeklaboratorium van ecotoxicologie van het RIZA alleen in gesloten flessen worden gehouden, aangezien er geen CO<sub>2</sub>-stoof aanwezig is. Omdat alle testen met de cellijnen in open platen werden uitgevoerd zijn de cellijnen na gewinning verder gekweekt in media die geen 5% CO<sub>2</sub> nodig hebben voor een goede pH stabilisatie.

RTG-2 en RTH-149 zijn verder gekweekt in een gemodificeerd MEM-Eagle medium (met 0.85 gram NaHCO<sub>3</sub> per liter in plaats van 2.2 gram per liter) met 10 mM HEPES, natriumpyruvaat, niet essentiële aminozuren, penicilline/streptomycine en 10% FBS bij een temperatuur van 21°C. ZF-4 is verder gekweekt in Leibowitz L-15 medium met natriumpyruvaat, niet essentiële aminozuren, penicilline/streptomycine en 10% FBS, bij een temperatuur van 28°C.

De kweek van RTG-2 en RTH-149 werd aangehouden in 75 cm<sup>2</sup> polystyreen celkweekflessen (Greiner 658170), twee flessen per lijn. Eén keer per week werd uit één van de flessen per lijn een subcultuur overgezet in twee nieuwe flessen door de cellen te trypsiniseren en per nieuwe fles 1/6 deel van de cellen uit de oude fles met nieuw medium in kweek te zetten. Dit wordt een paasage genoemd.

De kweek van ZF-4 werd aangehouden in 150 cm<sup>2</sup> flessen. Deze lijn groeit minder snel dan RTH-149 en RTG-2. Eén keer per week werd uit één van de flessen een subcultuur overgezet in twee nieuwe flessen door de cellen te trypsiniseren en per nieuwe fles 1/3 deel van de

cellen uit de oude fles met nieuw medium in kweek te zetten. De overgebleven cellen werden in kweek gehouden totdat ze gebruikt werden voor de cytotoxiciteits testen. De lijnen werden niet meer dan 50 passages in kweek gehouden voor deze testen. Hierna werd er weer een ampul met een lager passagenummer in kweek gezet.

## 2.3 Inzetten van de cytotoxiciteitstesten:

### 2.3.1 Stofftesten:

De 8 stoffen die werden gebruikt zijn elk met de drie cellijnen drie keer getest.

De testen werden uitgevoerd in 96-wells kweekplaten van Greiner (art nr: 655180). In de wells werd 50  $\mu$ l celsuspensie van één van de cellijnen gepipetteerd, met  $1.5 \cdot 10^4$  RTH-149 cellen,  $1 \cdot 10^4$  RTG-2 cellen of  $2 \cdot 10^4$  ZF-4 cellen per 50  $\mu$ l. Vervolgens werd van de teststoffen uit een stockoplossing een verdunningsreeks gemaakt in 1,5 reactievaatjes in kweekmedium. De stockoplossing was een geconcentreerde oplossing van de stof (10 mg/ml) in een geschikt oplosmiddel. Voor de twee metalen was dit fysiologisch zout, voor de overige stoffen was dit DMSO. De stockoplossingen werden niet langer dan 1 maand bewaard bij 4°C.

De concentraties in de verdunningsreeksen werd 2 x zo hoog gemaakt als de beoogde concentratie in de wells. Vervolgens werd per concentratie, in triplo 50  $\mu$ l per well bij de cellen gepipetteerd. Alleen de binnenste 60 wells van de platen werd gebruikt, om ongewenste effecten door bijvoorbeeld verdamping in de buitenste wells te vermijden. De platen werden in huishoudfolie verpakt en er werd gedurende 72 uur gekweekt bij de normale kweektemperatuur (21°C voor RTG-2 en RTH-149 en 28°C voor ZF-4). Hierna werden de kleuringen uitgevoerd (zie 2.4 - 2.6).

### 2.3.2 Testen van de effluenten:

Een 18-tal effluenten die tijdens het project op het lab werden aangeboden ter controle van de toxiciteit met guppentesten zijn ook op toxiciteit getest met de viscellijn RTH-149. Deze lijn bleek van de drie gebruikte lijnen de meest gevoelige te zijn.

Deze testen werden in dezelfde kweekplaten uitgevoerd als de stofftesten, met  $1.5 \cdot 10^4$  cellen per well. De cellen werden eerst in de platen gepipetteerd. Hierna werden de verdunningen van de effluenten toegevoegd.

3.6 ml effluent werd gemengd met 0.4 ml 10x geconcentreerd medium, 0.4 ml FBS en 0.2 ml van een stockoplossing met glutamine, penicilline, streptomycine, pyruvaat, HEPES en niet essentiële aminozuren. Vervolgens werd deze verdunning gesteriliseerd door filtratie met een 0.22  $\mu$ m membraanfilter. Hierna werd een verdunningsreeks gemaakt van het effluent.

Door de toevoeging van het medium was de hoogst mogelijke concentratie van de effluenten in de testen 0.711x. De overige geteste verdunningen van de effluenten zijn: 0.405x, 0.29x, 0.162x, 0.09x, 0.05x, 0.029x, 0.0162x en 0.009x.

De verdunningen werden in triplo in de wells bij de cellen in de plaat gepipetteerd. De hierboven genoemde verdunningen zijn de eindconcentraties in de kweekplaten. Hiertoe werd per well 50  $\mu$ l verdunning met een 2x zo hoge concentratie als de beoogde eindconcentratie gepipetteerd bij de 50  $\mu$ l celsuspensie.

Duur van de blootstelling en kweekomstandigheden waren hetzelfde als bij de stofftesten.

### 2.3.3 Testen van de oppervlaktewaterconcentraten:

Tijdens een onderzoek naar de toxiciteit van concentraten van oppervlaktewaterconcentraten (Maas 1999) is op verschillende data bij Lobith en Eijsden oppervlaktewater bemonsterd en volgens de zgn. KIWA- methode (Noordsij 1983) geconcentreerd. Met deze methode wordt het water met XAD geconcentreerd en bij verschillende pH geëluëerd in ethanol. De verkregen concentraten hebben een concentratiefactor van 25000x. In het onderzoek is de toxiciteit van de concentraten bepaald in o.a. testen met *Daphnia magna*. Een achttal concentraten, van 2 verschillende data bemonsterde waters bij Eijsden, is ook getest met RTH-149. De concentraten werd ingezet in de verdunningen: 31.25x, 55.56x, 100x, 178.6x, 312.5x, 555.6x, 1000x, en 1786x verdund. De uiteindelijke geteste concentratiefactor van het water was dan: 800x, 450x, 250x, 140x, 80x, 45x, 25x, 14x en 8x geconcentreerd. In de

kleinste verdunning van de concentraten was de concentratie ethanol: 3.2%. Deze concentratie heeft geen negatieve effecten op de cellijn, maar is wel meegenomen in de blanco controle.

De verdunningen werden in triplo bij de cellen in de plaat gepipetteerd. De hierboven genoemde verdunningen zijn de eindconcentraties. Hiertoe werd per well 50 µl verdunning met een 2x zo hoge concentratie als de beoogde eindconcentratie gepipetteerd bij 50 µl celsuspensie.

Duur van de blootstelling en kweekomstandigheden waren hetzelfde als bij de stofftesten.

### 2.4 Uitvoering van de kristalvioletkleuring:

- Na de blootstelling werden de supernatanten uit de wells gezogen.
- Hierna werden de in de wells nog aanwezige cellen gefixeerd door per well 100 µl 50% methanol/ijsazijn (3:1) toe te voegen. Er werd 10 minuten gefixeerd.
- Hierna werden de wells leeg geschud en de plaat werd gedroogd in een stoof bij 50°C gedurende 1 uur.
- Per well werd 100 µl 0.05% kristalviolet in 5% ethanol toegevoegd en er werd 20 minuten gekleurd.
- Na het verwijderen van de kristalviolet werden de wells een aantal keer gewassen met kraanwater en hierna één keer met demiwater.
- Per well werd 150 µl 70% ethanol toegevoegd.
- De plaat werd geschud op een 'plateshaker' gedurende 10 minuten.
- Vervolgens werd de absorptie in de wells gemeten bij 590 nm met een Bio-Tek Powerwave-X platereader.

### 2.5 Uitvoering van de neutraalroodkleuring:

- Een aantal uren voor de kleuring werd uit een stockoplossing van 0.4% neutraalrood in water een gebruikoplossing gemaakt van 100 µg/ml in medium. Deze gebruikoplossing werd vlak voor de kleuring gefiltreerd door een 0.22 µm membraanfilter om precipitaten te verwijderen.
- Per well werd 100 µl gebruikoplossing toegevoegd. Er werd 3 uur gekleurd bij kweektemperatuur.
- Het supernatant werd verwijderd en de wells werden 1x met medium gespoeld en 1x met 100 µl 1% formaldehyde/1% CaCl<sub>2</sub>.
- Hierna werd per well 200 µl 1% azijnzuur/50% ethanol toegevoegd.
- De plaat werd 10 minuten geschud.
- Vervolgens werd de absorptie in de wells gemeten bij 540 nm.

### 2.6 Uitvoering van de MTT kleuring:

- Van de stockoplossing MTT ((4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (M-2128 van Sigma)) van 5 mg/ml in PBS werd 20 µl per well toegevoegd.
- Er werd 6 uur gekleurd bij kweektemperatuur, in het donker.
- Het supernatant werd uit de wells verwijderd door voorzichtig uitpipetteren.
- Per well werd 150 µl DMSO toegevoegd.
- De plaat werd 10 minuten geschud en de absorptie in de wells werd gemeten bij 500 nm.

## 2.7 Berekening van de toxiciteit van de geteste stoffen, effluenten en oppervlaktewaterconcentraten:

Met de verkregen absorptiedata (in triplo per concentratie stof, effluent of concentraat) en de ingezette concentratie werden concentratie/effect curves verkregen. Met het programma KC-4 van Biotek (de fabrikant van de plate reader) werden de functies van deze curves berekend, er vanuit gaande dat sigmoïdale curves kunnen worden beschreven als een functie met 4 parameters:

$$f(x) = \frac{(a - d)}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} + d$$

Hierin is:

- a= de maximaal bereikbare y-waarde. In dit geval de gemiddelde absorptie van de wells zonder teststof (de blanco).
- b= een parameter die de helling van de curve aangeeft.
- c= de x-waarde (concentratie dus) waarbij 50% effect optreedt. De EC-50 dus.
- d= de minimaal bereikbare y-waarde. In dit geval de absorptie bij 100% effect.

Voor een goede plot van de curve is het van belang dat de concentratiereeks ook een concentratie bevat die 100% effect tweegbrengt. Bij de stoftesten is hier ook naar gestreefd. Bij een tweetal stoffen (pentachloorbenzeen en ethylparathion) lukte dit niet, aangezien deze concentratie boven de oplosbaarheid van de stoffen ligt. Ook met de effluenten werd bij de hoogst mogelijke concentratie geen 100% effect gevonden. Voor de extrapolatie van deze curves werd er vanuit gegaan dat bij een concentratie die 100x boven de hoogst bruikbare concentratie ligt er 100% effect optreedt als er bij deze hoogst bruikbare concentratie al een duidelijk effect was opgetreden (>15%).

Met behulp van de berekende parameters voor de curve zijn vervolgens de EC-10 en de EC-50 concentraties berekend.

Uit de verkregen gemiddelde absorpties bij de ingezette concentratie werd met de Dunnett's test voor vergelijking van gemiddelden de laagste concentratie bepaald waarbij er remming optrad (LOEC).

De 8 stoffen zijn per cellijn en per kleuring 3 x getest. Uit de drie afzonderlijke bepalingen van de cytotoxiciteit zijn de gemiddelde EC-10, de EC-50 en LOEC berekend. Op deze manier konden de gevoeligheden van de drie cellijnen met de drie kleuringen voor de stoffen onderling worden vergeleken alsmede met de bekende LC-50 concentraties voor Guppys.

Op dezelfde wijze als er voor de stoffen een concentratie/respons curve kon worden berekend werd ook voor de effluenten en oppervlaktewaterconcentraten een verdunning/respons en concentratiefactor/respons curve berekend, met de hieruit voortvloeiende EC-10, EC-50 en LOEC waarden. Deze waarden zijn vergeleken met de gevonden effecten van de effluenten en concentraten in vistesten met Guppy's en Daphnia's.





### 3 Resultaten:

#### 3.1 Stofftesten

De twee lijnen van Regenboogforel (RTH-149 en RTG-2) gaven geen problemen bij het in kweek zetten in de media die door de leveranciers werden geadviseerd. Beide lijnen zijn eerst opgekweekt in standaard MEM-Eagle medium met 10% FBS, niet essentiële aminozuren en natriumpyruvaat in een atmosfeer met 5% CO<sub>2</sub>. Hierna werden de cellen gewend aan medium met 10 mM HEPES en een lagere concentratie NaHCO<sub>3</sub> (waardoor het medium bruikbaar is in een atmosfeer zonder extra CO<sub>2</sub>). Beide lijnen lieten zich makkelijk in dit medium kweken. Van beide lijnen is eerst een bulk kweek opgezet om een goede voorraad in de vloeibare stikstof te verkrijgen. Hierna is begonnen met het uitvoeren van de cytotoxiciteitstesten.

ZF-4 bleek na het in kweek zetten in het door de leverancier geadviseerde medium (een 1:1 mengsel van Ham's F12 en DMEM met 10% FBS, niet essentiële aminozuren en natriumpyruvaat in een atmosfeer met 5% CO<sub>2</sub>) zich in eerste instantie niet te delen. De lijn bleef gedurende een aantal weken stationair, terwijl er wel wat cellen dood gingen. Na 2 weken afwachten zijn de overgebleven cellen weer uit de kweekfles gehaald en overgebracht naar een kweekfles met een veel kleiner kweekoppervlak. Hierdoor hadden de overgebleven cellen (er waren er toen nog zo'n  $5 \cdot 10^4$  over) ook fysiek contact. Dit bleek voldoende om de lijn weer aan het delen te krijgen. Hoewel de lijn zich erg langzaam vermeerderd (de populatie verdubbelingstijd is ongeveer 6 dagen), kon vanaf dat moment de lijn weer opgekweekt worden. Nadat er weer voldoende cellen in kweek waren, is de kweek gesplitst waarna één deel van de kweek is gewend aan Leibowitz L-15 medium met 10% FBS, niet essentiële aminozuren en natriumpyruvaat. Hier bleek de lijn erg goed in te groeien (maar nog steeds wel langzaam). Hierna is de lijn gekloneerd aangezien de lijn er morfologisch niet homogeen uitzag. Uit deze klonering zijn een drietal klonen geselecteerd die een mooie constante morfologie te zien geven. Van deze drie is één kloon gebruikt voor de cytotoxiciteitstesten (kloon ZF-4 1A1).

Voor iedere stof en kleuring zijn de LOEC, EC-10 en EC-50 in de drie cellijnen bepaald tijdens drie afzonderlijke experimenten. Uit deze drie schattingen van deze effectparameters zijn de gemiddelde waarden berekend voor iedere stof, met de drie kleuringen. In tabel 1 en 2 zijn de aldus verkregen resultaten samengevoegd.

In de tabel staan de standaardafwijkingen in de bepaalde effectparameters tussen haakjes achter de gemiddelden. Tevens staan in tabel 1 de bekende LC-50 literatuurwaarden van de stoffen voor 3 relevante organismen weergegeven: De Guppy (*Poecilia reticulata*), Regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*) en de Watervlo (*Daphnia magna*). De Guppy is het organisme waarmee op het RIZA vistesten worden uitgevoerd. Uit de Regenboogforel zijn twee van de drie hier gebruikte cellijnen geïsoleerd. De watervlo is een diersoort die op het RIZA veel wordt gebruikt voor het testen van waterige monsters, en poriewater van waterbodems.

De in de tabel weergegeven LOEC waarden zijn vaak hoger dan de berekende EC-10 waarden. De oorzaak hiervan is dat de opzet van de testen niet was om een zo goed mogelijke schatting te kunnen doen van de LOEC. De concentratiereeksen zijn zo gekozen dat er over het gehele toxiciteitstraject een gelijkmatige verdeling van de testconcentraties was. De LOEC wordt dan, als berekende laagste concentratie waarbij een significant effect optreedt niet heel nauwkeurig bepaald. Als de stappen in de concentraties kleiner worden gekozen bij de lagere concentraties zal de gevonden LOEC vrijwel zeker lager worden dan de EC-10.

Tabel 1: Gevonden LOEC, EC-10 en EC-50 waarden bij de drie cellijnen met de kristalviolet kleuring. Gegeven zijn de gemiddelden van drie afzonderlijke bepalingen met tussen haakjes de standaardafwijkingen.

Stof	cas-nr MW	<b>Daphnia magna</b> LC50 48h in $\mu\text{M}$	<b>Regenboogforel</b> LC50 96h in $\mu\text{M}$	<b>Guppy</b> LC50 96h ( $\mu\text{M}$ )	<b>RTG-2 cytotox</b> <b>kristalviolet</b> EC10 $\mu\text{M}$ EC50 $\mu\text{M}$ LOEC $\mu\text{M}$	<b>RTH-149 cytotox</b> <b>kristalviolet</b> EC10 $\mu\text{M}$ EC50 $\mu\text{M}$ LOEC $\mu\text{M}$	<b>ZF-4 cytotox</b> <b>kristalviolet</b> EC10 $\mu\text{M}$ EC50 $\mu\text{M}$ LOEC $\mu\text{M}$
Cadmium-chloride	10108-64-2 183.31	0.0927	7.09	6.93	29.9 (11.0) 42.3 (6.8) 37.0 (30.5)	9.03 (7.02) 21.6 (4.04) 4.29 (6.22)	12.6 (2.7) 23.7 (8.1) 17.5 (14.1)
Kalium-dichromaat	7778-50-9 294.18	6.15	200	102.3 605.1 (lab)	0.844 (0.567) 24.32 (4.06) 0.60 (0.69)	2.27 (3.13) 34.1 (26.2) 4.20 (3.07)	2.89 (2.71) 8.43 (4.06) 3.70 (6.22)
tributyltin-chloride	1461-22-9 325.49	0.0553	0.0338	0.06(lab)	0.270 (0.012) 0.713 (0.127) 0.37 (0.31)	0.113 (0.055) 0.421 (0.169) 0.07 (0.08)	0.236 (0.161) 0.409 (0.073) 0.04 (0.03)
4-nitro quinoline 1-oxide	56-57-5 190.16	1.84		>526	0.412 (0.037) 1.22 (0.07) 0.43 (0.16)	0.0751 (0.0557) 0.438 (0.269) 0.04 (0.06)	0.410 (0.224) 0.820 (0.767) 0.20 (0.29)
3,4-dichloor aniline	95-76-1 162.02	1.41	12.0	21.4	25.8 (11.0) 340 (104) 9.57 (3.92)	56.6 (85.9) 311 (229) 21.9 (27.8)	144 (157) 519 (229) 256 (318)
pentachloor-benzeen	608-93-5 250.34	21.4	5.75	0.54	49.4 (27.3) 4053 (6585) 22.0 (25.4)	118 (67.9) 7431 (6283) 30.3 (19.3)	33.5 (7.1) 82.1 (11.8) 50.6 (18.5)
ethyl-parathion	56-38-2 291.26	0.00343	4.77	0.19	166.6 (130) 1812 (1385) 95.8 (73.6)	20.1 (21.5) 4818 (4100) 11.9 (7.33)	50.1 (29.1) 233 (248) 111 (50)
3,4-benzo-pyreen	50-32-8 252.31	0.0198		>396	0.995 (0.542) 1.90 (0.464) 0.54 (0.25)	0.636 (0.143) 1.54 (0.64) 0.23 (0.19)	1.76 (0.60) 23.0 (4.5) 0.46 (0.53)

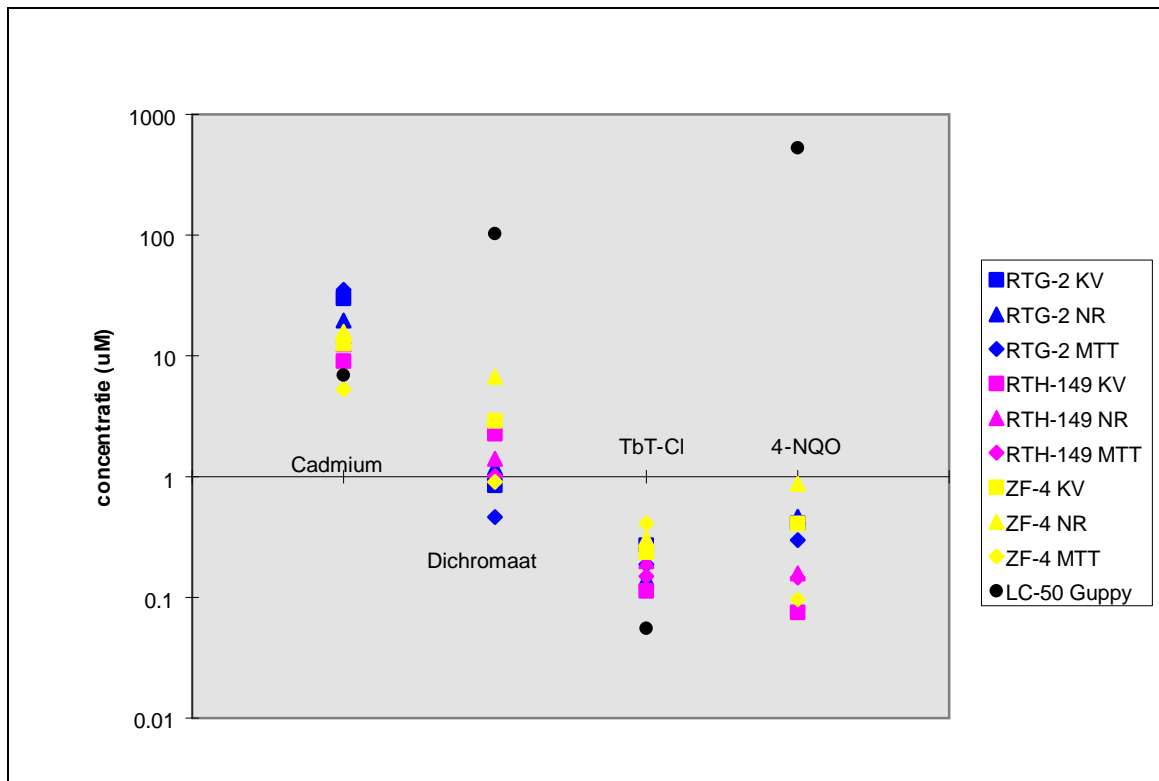
## Toepassing van vis cellijnen bij de beoordeling van de toxiciteit van stoffen en effluënten

Tabel 2: Gevonden LOEC, EC-10 en EC-50 waarden bij de drie cellijnen met de neutraalrood kleuring en de MTT kleuring. Gegeven zijn de gemiddelden van drie afzonderlijke bepalingen met tussen haakjes de standaardafwijkingen.

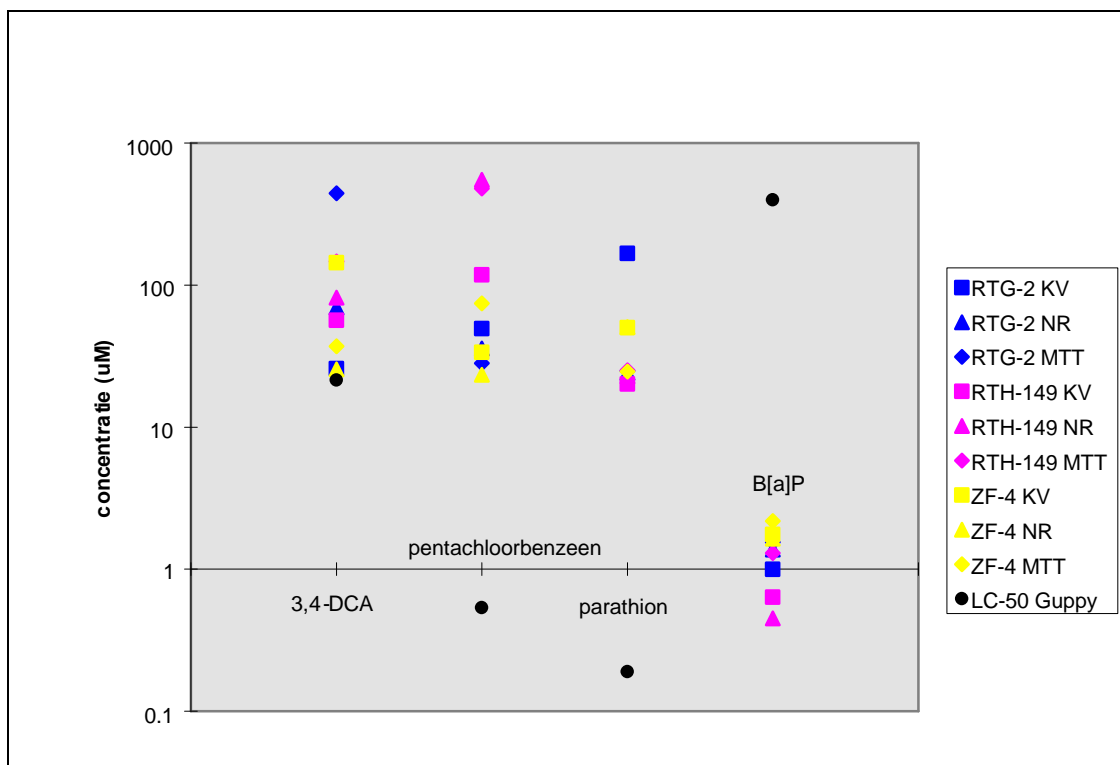
Stof	<b>RTG-2 cytotox neutraal rood</b> EC10 $\mu$ M EC50 $\mu$ M LOEC $\mu$ M	<b>RTH-149 cytotox neutraal rood</b> EC10 $\mu$ M EC50 $\mu$ M LOEC $\mu$ M	<b>ZF-4 cytotox neutraal rood</b> EC10 $\mu$ M EC50 $\mu$ M LOEC $\mu$ M	<b>RTG-2 cytotox MTT</b> EC10 $\mu$ M EC50 $\mu$ M LOEC $\mu$ M	<b>RTH-149 cytotox MTT</b> EC10 $\mu$ M EC50 $\mu$ M LOEC $\mu$ M	<b>ZF-4 cytotox MTT</b> EC10 $\mu$ M EC50 $\mu$ M LOEC $\mu$ M
Cadmium-chloride	19.7 (15.4) 1.19 (1.28) 40.2 (24.9)	12.5 (1.2) 23.3 (3.5) 22.2 (9.5)	15.9 (5.73) 22.1 (3.1) 12.8 (12.3)	35.1 (9.0) 49.3 (6.1) 54.6 (0.01)	12.7 (2.4) 24.3 (3.8) 19.4 (8.9)	5.30 (6.27) 16.8 (12.9) 13.2 (11.6)
Kalium-dichromaat	1.19 (1.28) 9.35 (3.62) 0.49 (0.54)	1.41 (0.46) 19.0 (7.5) 3.29 (0.20)	6.69 (0.78) 9.17 (0.35) 10.88 (0.01)	0.464 (0.019) 10.4 (0.4) 0.16 (0.16)	1.01 (0.19) 12.6 (2.5) 1.13 (0.44)	0.904 (0.162) 4.11 (0.34) 0.59 (0.43)
tributyltin-chloride	0.143 (0.056) 0.294 (0.056) 0.06 (0.01)	0.200 (0.052) 0.413 (0.063) 0.17 (0.12)	0.304 (0.051) 0.395 (0.068) 0.12 (0.16)	0.187 (0.041) 0.718 (0.111) 0.05 (0.02)	0.149 (0.060) 0.514 (0.139) 0.16 (0.14)	0.410 (0.194) 0.624 (0.243) 0.42 (0.20)
4-nitro quinoline 1-oxide	0.466 (0.243) 0.942 (0.260) 0.11 (0.01)	0.158 (0.068) 0.832 (0.351) 0.25 (0.01)	0.871 (1.054) 1.19 (1.35) 0.28 (0.24)	0.297 (0.160) 1.43 (0.46) 0.23 (0.26)	0.145 (0.045) 0.729 (0.213) 0.34 (0.16)	0.096 (0.092) 0.238 (0.167) 0.09 (0.03)
3,4-dichloor aniline	69.4 (81.8) 439 (246) 10.7 (3.9)	81.7 (18.2) 364 (44) 84.4 (39.2)	25.5 (12.8) 398 (141) 130 (68)	444 (28) 719 (23) 228 (338)	147 (200) 428 (300) 16.1 (11.7)	37.0 (13.8) 490 (57) 32.3 (27.9)
pentachloor-benzeen	35.7 (22.1) 189 (52) 42.6 (40.0)	550 (468) 1040 (775) 299 (467)	23.4 (2.43) 60.9 (9.6) 306 (461)	28.2 (6.7) 130 (25) 52.3 (53.6)	480 (137) 1161 (998) 51.3 (46.0)	74.4 (80.37) 362 (244) 40.0 (0.1)
ethyl-parathion	24.1 (6.0) 457 (393) 45.8 (37.0)	22.7 (27.8) 104 (32) 28.3 (10.5)	50.5 (47.9) 141 (144) 28.3 (10.5)	24.9 (10.1) 154 (56) 58.9 (76.1)	25.2 (10.5) 98.9 (60.5) 34.8 (32.3)	24.7 (6.7) 63.3 (20.7) 34.3 (0.1)
3,4-benzo-pyreen	1.38 (0.52) 1.90 (0.58) 6.26 (10.71)	0.451 (0.148) 1.26 (0.67) 0.17 (0.19)	1.64 (0.62) 5.62 (0.60) 2.91 (1.49)	1.55 (0.23) 2.87 (0.70) 0.58 (0.87)	1.30 (0.90) 2.94 (2.32) 2.22 (1.60)	2.18 (0.77) 11.0 (3.5) 2.92 (1.81)

Voor een beter inzicht in de onderlinge verschillen tussen de cellijnen en de drie kleuringen zijn in de figuren 1 t.m. 4 de afzonderlijke EC10 en EC50 waarden per stof nog eens uitgezet.

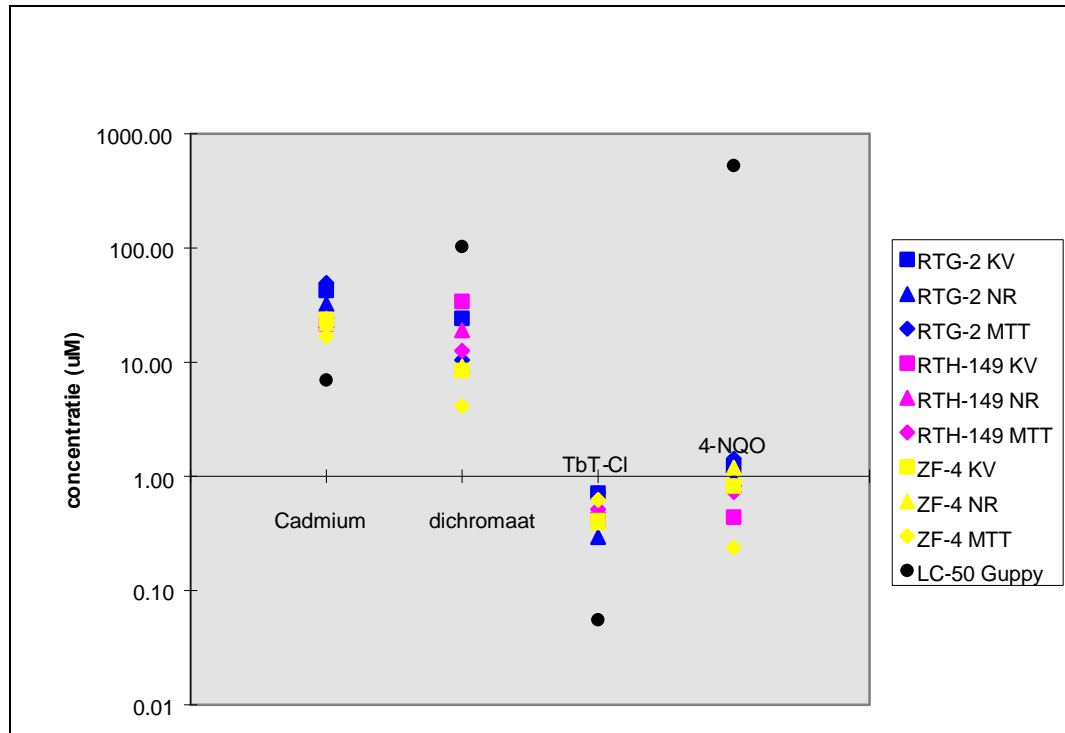
Figuur 1: Vergelijking EC-10 waarden van Cd, Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, TbT-Cl en 4-NQO:



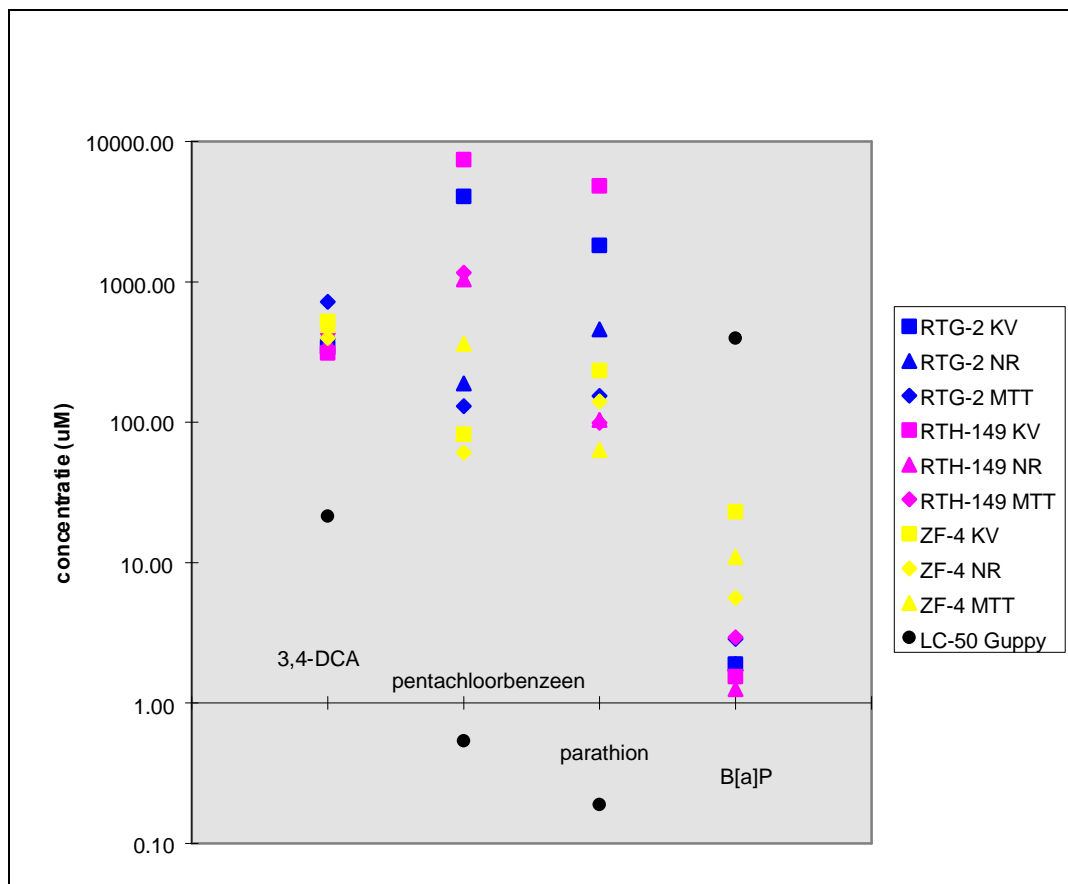
Figuur 2: Vergelijking EC-10 waarden 3,4-dichlooraniline, pentachloorbenzeen, parathion en benzo[a]pyreen:



figuur 3: Vergelijking EC-50 waarden van Cd, Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, TbT-Cl en 4-NQO



Figuur 4: Vergelijking EC-50 waarden van 3,4 dichlooraniline, pentachloorbenzeen, parathion en benzo[a]pyreen:



De overige parameters van de dosis/effectcurve berekening voor de stoffen met de drie kleuringen in de drie cellijnen staan in bijlage 6.1 verzameld.

Voor cadmium blijkt RTG-2 de minst gevoelige cellijn te zijn. ZF-4 is met de MTT kleuring het gevoeligst voor cadmium.

Voor dichromaat blijkt RTG-2 juist de gevoeligste cellijn en ZF-4 de minst gevoelige van de drie.

Voor TbT-Cl en 4-NQO is RTH-149 de gevoeligste cellijn met de KV kleuring als gevoeligste kleuring.

Voor 3,4-DCA is ZF-4 met de NR kleuring en RTG-2 met de KV kleuring het gevoeligst.

Voor pentachloorbenzeen is ZF-4 met de NR kleuring het gevoeligst.

Voor parathion is RTH-149 met de KV kleuring het gevoeligst en voor benzo[a]pyreen RTH-149 met de NR kleuring.

Het is duidelijk dat de onderlinge gevoeligheden van de lijnen en kleuringen verschillen per stof. Als we per stof de effectconcentraties op volgorde van gevoeligheid zetten, waardoor we een soort ranking krijgen, en vervolgens de gemiddelde ranking van iedere effectparameter berekenen krijgen we de getallen die in tabel 3 staan gegeven:

Tabel 3: ranking van de effectparameters per teststof: De effectparameter met de laagste ranking is de gevoeligste parameter voor die stof.

Effect parameter	Cd	rank	Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	rank	TbT-Cl	rank	4-NQO	rank	3,4-DCA	rank	pentaC B	rank	para thion	rank	B[a]P	rank
LC-50 Guppy	6.93	2	102.3	19	0.06	1	526	19	21.4	1	0.54	1	0.19	1	396	19
RTG-2 KV EC10	29.9	15	0.84	2	0.27	8	0.41	8	25.8	3	49.4	6	166	15	0.99	3
RTG-2 NR EC10	19.7	9	1.19	5	0.14	3	0.47	10	69.4	6	35.7	5	24.1	4	1.38	6
RTG-2 MTT EC10	35.2	17	0.46	1	0.19	5	0.30	6	443	16	28.2	3	24.9	6	1.55	8
RTG-2 KV EC50	42.3	18	24.2	17	0.71	18	1.22	17	341	11	4053	18	1812	18	1.90	11
RTG-2 NR EC50	32.3	16	9.35	13	0.29	9	0.94	15	439	15	189	12	458	17	1.90	12
RTG-2 MTT EC50	49.3	19	10.41	14	0.72	19	1.43	18	719	19	130	11	154	14	2.87	14
RTH-149 KV EC10	9.03	3	2.27	7	0.11	2	0.08	1	56.6	5	118	10	20.1	2	0.64	2
RTH-149 NR EC10	12.5	4	1.41	6	0.20	6	0.16	4	81.7	7	551	15	22.7	3	0.45	1
RTH-149 MTT EC10	12.7	6	1.01	4	0.15	4	0.15	3	147	9	480	14	25.2	7	1.30	5
RTH-149 KV EC50	21.6	10	34.1	18	0.42	15	0.44	9	311	10	7432	19	4818	19	1.54	7
RTH-149 NR EC50	23.3	12	19.0	16	0.41	14	0.83	13	364	12	1040	16	104	12	1.26	4
RTH-149 MTT EC50	24.3	14	12.6	15	0.51	16	0.73	11	428	14	1161	17	99.0	11	2.94	15
ZF-4 KV EC10	12.6	5	2.89	8	0.24	7	0.41	7	144	8	33.5	4	50.1	8	1.76	10
ZF-4 NR EC10	15.9	7	6.69	10	0.30	10	0.87	14	25.5	2	23.4	2	50.5	9	1.64	9
ZF-4 MTT EC10	5.30	1	0.90	3	0.41	13	0.10	2	37.0	4	74.5	8	24.7	5	2.18	13
ZF-4 KV EC50	23.7	13	8.43	11	0.41	12	0.82	12	519	18	82.1	9	232	16	23.0	18
ZF-4 NR EC50	22.1	11	9.17	12	0.39	11	1.19	16	398	13	60.9	7	141	13	5.62	16
ZF-4 MTT	16.8	8	4.11	9	0.62	17	0.24	5	490	17	362	13	63.3	10	11.0	17

## Toepassing van vis cellijnen bij de beoordeling van de toxiciteit van stoffen en effluenten

---

EC50																
------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--



De gemiddelde ranking van de effectparameters is gegeven in tabel 4:

Tabel 4: gemiddelde ranking van de effectparameters:

Effectparameter	gemiddelde ranking
LC-50 Guppy	7.9
RTG-2 KV EC10	7.5
RTG-2 NR EC10	6
RTG-2 MTT EC10	7.8
RTG-2 KV EC50	16
RTG-2 NR EC50	13.6
RTG-2 MTT EC50	16
RTH-149 KV EC10	4
RTH-149 NR EC10	5.8
RTH-149 MTT EC10	6.5
RTH-149 KV EC50	13.4
RTH-149 NR EC50	12.4
RTH-149 MTT EC50	14.1
ZF-4 KV EC10	7.1
ZF-4 NR EC10	7.9
ZF-4 MTT EC10	6.1
ZF-4 KV EC50	13.6
ZF-4 NR EC50	12.4
ZF-4 MTT EC50	12

Uit deze tabel is af te leiden dat op basis van de gemiddelde ranking van de effectparameters met de verschillende cellijnen, RTH-149 als meest gevoelige lijn van de drie geteste lijnen kan worden gezien met een gemiddelde ranking van 5.4. Gemiddeld genomen is de RTH-149 als we naar de EC-10 waarden kijken gevoeliger dan de Guppy LC-50, maar voor de EC-50 van de cytotoxiciteitsbepalingen geldt dat deze minder gevoelig zijn dan de in vivo test met Guppy's

De kristalvioletkleuring is in RTH-149 de kleuring met gemiddeld de hoogste gevoeligheid. Aangezien ook de overige twee kleuringen met RTH-149 erg gevoelig bleken te zijn (NR kleuring een ranking van 5.8 en de MTT kleuring een ranking van 6.5) werd besloten om de testen met effluënten en oppervlaktewaterconcentraten uit te voeren met RTH-149, met alle drie de kleuringen.

### 3.2 Resultaten met effluenten:

Gedurende de periode januari 1999 tot april 2000 zijn de bij het RIZA binnengekomen effluenten voor vistesten met Guppy's ingevroren om later getest te worden met één of meerdere vis cellijnen. Daarnaast zijn effluenten in de laatste maanden van 2000 binnengekomen en gekoeld bewaard bij 4°C. De ingevroren effluenten, 9 stuks, en de bij 4°C bewaarde 9 effluenten zijn getest met RTH-149 volgens de werkwijze die in het materiaal en methoden hoofdstuk is beschreven.

In tabel 5 zijn van deze 18 effluenten de uitslagen van deze testen weergegeven, naast de gevonden toxiciteit van de effluenten voor Guppy en Daphnia. De toxiciteit voor de twee organismen is gegeven in % effluent waarbij 50% sterfte optreedt (de LC-50 dus). De toxiciteit voor de cellijn is met de drie kleuringen weergegeven in % effluent waarbij 10% effect, 50% effect of de drempelconcentratie waarbij significant effect optreedt, respectievelijk de EC-10, EC-50 en LOEC. Als er geen definieerbaar toxisch effect optrad wordt de toxiciteit weergegeven als groter dan de hoogst geteste concentratie.

Bij de kleuringen met neutraal rood trad bij een aantal geteste effluenten een apart te vermelden effect op: Bij een toenemende concentratie effluent werd na de blootstelling een steeds hogere hoeveelheid kleurstof in de cellen in de wells opgenomen. Hierdoor werd de gevonden absorptie na de neutraalroodkleuring na blootstelling aan oplopende concentraties effluent steeds hoger in plaats van steeds lager. Het laatste is wat bij toxiciteit wordt verwacht. Bij de KV en MTT kleuring werd met deze effluenten wel een toxisch effect waargenomen, maar dit effect was niet groot. De EC-10 waarden van deze effluenten waren dus niet laag, zeker niet als ze vergeleken worden met de toxiciteit van deze effluenten voor Guppy en Watervlo. Bij microscopische observatie van de cellen na blootstelling aan deze effluenten bleek dat de cellen grote vacuoles hadden ontwikkeld. Blijkbaar is de inhoud van deze organellen zuur, aangezien NR er duidelijk zichtbaar in accumuleert. Of het hier om lysosomen gaat is niet met zekerheid te zeggen. Opvallend is dat juist deze effluenten de hoogste toxiciteit voor Daphnia vertoonden.

De effluenten die na blootstelling verhoogde neutraalrood opname te zien gaven zijn in tabel 5 blauw weergegeven.

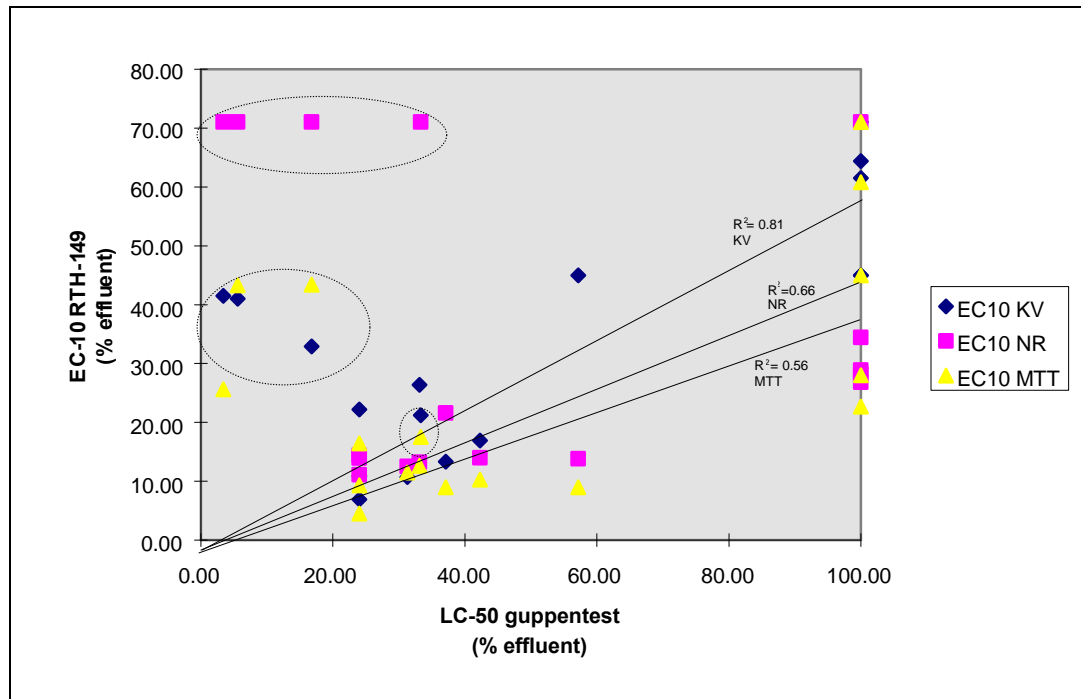
De waarden van tabel 5 zijn in figuur 5 nog eens weergegeven om een beeld te geven van gevoeligheid van de cellijn ten opzichte van de guppientest.

Tabel 5: Vergelijking van de toxiciteitsuitslagen van 18 effluenten met de guppentest en Daphniatest vs de cytotoxiciteitstest met RTH -149:

Effluent nummer	guppentest LC 50	daphniatest LC50	cytotoxiciteitstesten EC10			cytotoxiciteitstesten EC50			cytotoxiciteitstesten LOEC		
			KV	NR	MTT	KV	NR	MTT	KV	NR	MTT
99010383/47	3.41%	4.23%	41.5%	oplopend	25.6%	90.9%	oplopend	45.0%	71.1%	oplopend	29.0%
99014506/47	> 100%	42.3%	>45%	28.9%	>45%	> 45%	65.7%	>45%	>45%	45.0%	>45%
99014708/47	24.0%	13.4%	22.2%	13.9%	16.4%	28.5%	37.3%	27.3%	25%	14.5%	25.0%
99015019/47	> 100%	57.8%	64.4%	34.4%	60.8%	74.5%	56.8%	106%	71.1%	>7.11%	71.1.0%
99016205/47	> 100%	74.8%	>45%	26.8%	22.7%	>45%	87.8%	91.6%	>45%	25.0%	25.0%
99016337/47	57.2%	24.0%	>45%	13.8%	9.0%	>45%	28.4%	28.6%	45%	25.0%	8.1%
99017154/47	5.6%	5.91%	41.0%	oplopend	43.3%	94.0%	oplopend	78.9%	71.1%	oplopend	40.5%
99018127/47	> 100%	74.8%	61.5%	28.2%	28.0%	75.0%	61.0%	65.1%	71.1%	40.5%	40.5%
99018290/47	37.1%	17.8%	13.3%	21.6%	9.0%	24.2%	31.0%	48.9%	16.2%	29.0%	2.9%
00100826/47	33.3%	3.24%	21.2%	oplopend	17.5%	136%	oplopend	138%	>71%	oplopend	>71%
00104819/47	42.3%	13.4%	16.9%	14.0%	10.3%	25.6%	27.3%	30.5%	29.0%	16.2%	5.0%
00105141/47	109%	74.8%	51.1%	46.9%	57.8%	86.7%	79.7%	93.0%	29%	81.0%	81.0%
00105283/47	31.3%	13.4%	10.7%	12.5%	11.5%	29.2%	27.6%	51.0%	29%	9.0%	9.0%
00107354/47	16.8%	13.4%	32.9%	oplopend	43.4%	130%	oplopend	122.5%	29%	oplopend	16.2%
00108085/47	>100%	>100%	>71.1%	>71.1%	>71.1%	>71.1%	>71.1%	>71.1%	>71.1%	>71.1%	>71.1%
00113101/47	24.0%	13.4%	10.9%	14.4%	9.3%	20.1%	26.9%	27.7%	16.2%	16.2%	9.0%
00114174/47	33.1%	13.4%	26.4%	13.2%	12.6%	28.8%	28.8%	31.5%	29.0%	16.2%	5.0%
00117416/47	24.0%	10.4%	6.9%	11.1%	4.5%	18.1%	22.6%	39.6%	29%	16.2%	2.9%

Blauw: met als effect toegenomen NR opname bij oplopende concentraties

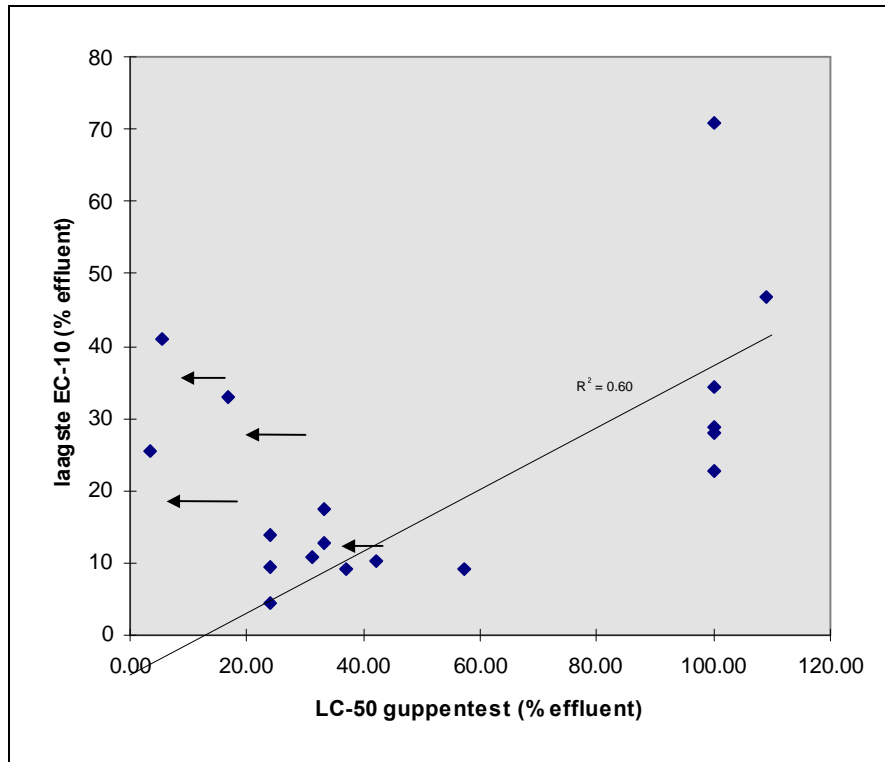
Figuur 5: Vergelijking van de gevonden LC-50 waarden van effluënten met de gevonden EC-10 waarden met RTH-149: De waarden van de effluënten die de NR toename veroorzaakten zijn omcirkeld.



In figuur 5 zijn een drietal trendlijnen ingetekend die zijn berekend uit de waarden van de afzonderlijke kleuringen zonder de waarden van de effluënten die de NR toename veroorzaakten.

Er vanuit gaande dat bij het gebruik van een cellijn als RTH-149 met drie eindpuntskleuringen de gevoeligste kleuring bij iedere test een maat voor de toxiciteit van het effluent is kan deze figuur vereenvoudigd worden tot een figuur waarbij voor ieder effluent de laagste EC-10 wordt uitgezet tegen de gevonden LC-50 in de guppentest. Dit is in figuur 6 weergegeven. Afgezien van een paar afwijkende punten is de correlatie tussen de guppentest en de EC-10 waarden redelijk. De afwijkende punten zijn vooral afkomstig van de al eerder genoemde effluënten die een oplopende neutraalroodopname te zien gaven bij oplopende concentraties. Ook in deze figuur is een trendlijn ingetekend die is berekend uit de waarden zonder de met de pijlen aangegeven punten.

Figuur 6: Vergelijking guppentest met de gevoeligste kleuring per effluent: : De waarden van de effluenten die de NR toename veroorzaakten zijn aangewezen met de pijlen.



### 3.3 Resultaten van de testen met oppervlaktewaterconcentraten:

Van een 8 tal concentraten van oppervlaktewater uit de Rijn bij Lobith en de Maas bij Eijsden die op verschillende tijdstippen zijn bemonsterd is de toxiciteit met RTH-149 bepaald en vergeleken met de gevonden toxiciteit voor *Daphnia magna*.

De resultaten van de gevonden LOEC, EC-10 en EC-50 waarden voor RTH-149 en de LC-50 waarden van de concentraten zijn in tabel 6 samengevat.

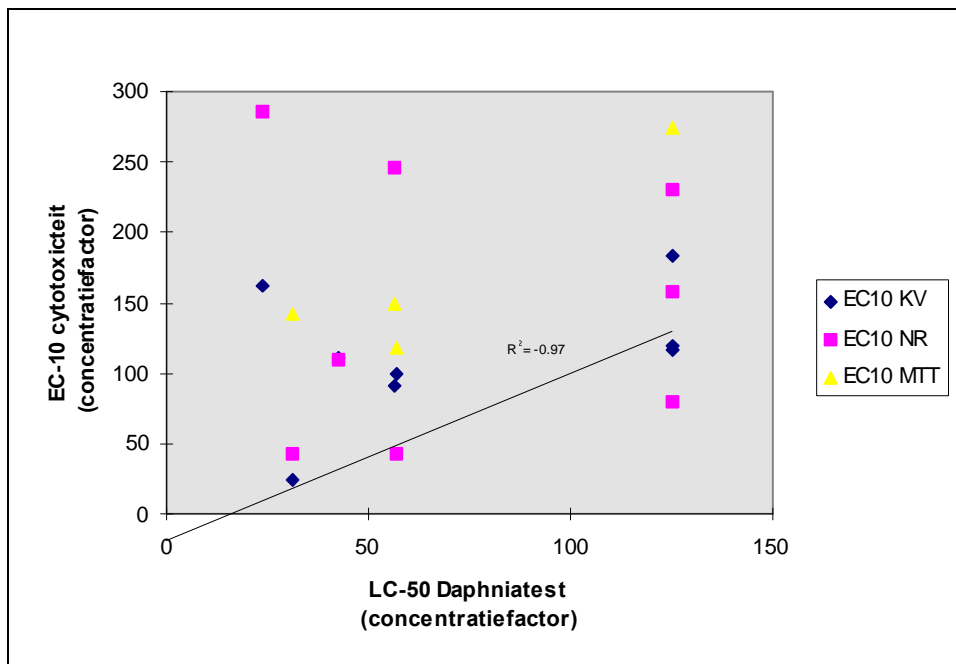
Tabel 6: Resultaten van de toxiciteitstesten met oppervlaktewaterconcentraten op RTH-149: De opgegeven waarden zijn in concentratiefactoren van het water, dus het aantal maal dat het water moest worden geconcentreerd voordat het genoemde effect optrad.

concentraat	daphniatest	cytotoxiciteitstesten EC10			cytotoxiciteitstesten EC50			cytotoxiciteitstesten LOEC		
	LC-50	KV	NR	MTT	KV	NR	MTT	KV	NR	MTT
Eijsden 14-7-98 pH 2	> 62.5	184	79.4	274	443	240	400	140	80	450
Eijsden 14-7-98 pH 7	31.2	24.5	43	142	273	170	405	80	45	45
Lobith 14-7-98 pH 2	23.9	162	286	>800	977	736	>800	45	250	>800
Eijsden 8-9-98 pH 2	>62.5	120	158	>800	852	460	>800	140	450	>800
Lobith 9-9-98 pH 2	> 62.5	116	230	>800	743	567	>800	140	250	>800
Lobith 9-9-98 pH 7	56.4	90.7	246	150	511	638	1221	140	450	80
Eijsden 3-11-98 pH 2	57.1	99.4	42.4	118	323	118	176	25	45	140
Eijsden 3-11-98 pH 7	42.8	111	109	567	748	318	849	45	45	140

In figuur 7 zijn de LC-50 concentraties uitgezet tegen de gevonden EC-10 concentraties met de verschillende kleuringen voor een beter beeld van het verband hiertussen.

Door de keuze van de schaal van de y-as vallen de hoogste waarden van de EC-10 concentraties buiten de figuur. In deze figuur is een trendlijn getekend op basis van de gevoeligste kleuring per concentraat. De berekende correlatiecoëfficiënt geeft aan dat er tussen de LC-50 in *Daphnia* en de gevoeligste kleuringen in de vis cellijntesten geen goede correlatie is.

Figuur 7: Verband tussen de LC-50 in Daphnia's en EC-10 in RTH-149 in concentraten van oppervlaktewater:







## 4 Discussie:

### Stoftesten

Bij de vergelijking van de uitkomsten van de stoftesten op basis van de cellijnen met de LC-50 waarden voor Guppy's (voor zover deze bekend zijn) valt ten eerste op dat er soms vrij grote verschillen bestaan tussen de gevoeligheden van de cellijnen onderling per stof. Met name voor de narcotiserende stoffen zijn de verschillen aanzienlijk. Zo bleek bijvoorbeeld voor 3,4 dichlooraniline ZF-4 met een neutraalrood kleuring het gevoeligst te reageren met een EC-10 van 25.5  $\mu\text{M}$ , terwijl dezelfde stof met de cellijn RTG-2 en de MTT kleuring een EC-10 van 444  $\mu\text{M}$  te zien gaf (ruim 17 x zo hoog). Ook voor pentachloorbenzeen is het verschil tussen de gevoeligste cellijn en kleuring (ZF-4 met neutraalroodkleuring, EC-10 23.4  $\mu\text{M}$ ) en de ongevoeligste (RTH-149 met neutraalroodkleuring, EC-10 550  $\mu\text{M}$ ) groot: 23.5 x.

De toxiciteit van cadmium voor de cellijnen is vergelijkbaar met die voor Guppy's: LC-50: 6.93  $\mu\text{M}$  en EC-10: 5.3 - 35.1  $\mu\text{M}$ . Dit in tegestelling tot het andere metaal dat in dit project is meegenomen: dichromaet. De cellijnen blijken veel gevoeliger voor dichromaet te zijn dan vissen: LC-50: 102.3  $\mu\text{M}$  en EC-10: 0.64 - 6.69  $\mu\text{M}$ . Ook de EC-50 concentraties liggen lager: 4.11 - 34.1  $\mu\text{M}$ . Een mogelijke verklaring is te vinden in het feit dat dichromaet minder goed accumuleert in vissen maar blijkbaar wel veel cytotoxischer is dan cadmium.

TbT-Cl is voor vissen ongeveer even toxisch als voor de cellijnen: LC-50: 0.06  $\mu\text{M}$  en EC-10: 0.11 - 0.41  $\mu\text{M}$ . Bij 4-NQO zijn de verschillen weer zeer groot. Aangezien er geen literatuurgegevens gevonden konden worden over de toxiciteit van 4-NQO voor Guppy's is geprobeerd de LC-50 te schatten aan de hand van een pilotexperiment op het RIZA. De hoogst geteste concentratie was 100 mg/l (= 526  $\mu\text{M}$ ). Bij deze concentratie werd nog geen sterfte gevonden. Voor het gemak is de LC-50 gesteld op 526  $\mu\text{M}$ , hoewel deze in werkelijkheid dus veel hoger ligt. De EC-10 van 4-NQO met de drie cellijnen ligt tussen 0.075 en 0.87  $\mu\text{M}$ . Een zeer groot verschil met de vistesten dus. Blijkbaar zijn vissen goed in staat de toxische effecten van deze stof te neutraliseren, mogelijk door detoxificatie in de lever.

Voor 3,4 dichlooraniline wordt in de literatuur een LC-50 voor Guppy van 21.4  $\mu\text{M}$  gerapporteerd. De gevonden EC-10 waarden met de vis cellijnen liggen hier wel boven (25.5 - 444  $\mu\text{M}$ ), maar meestal in ongeveer dezelfde ordegrrootte. Dit blijkt niet het geval met de andere stof die een narcotisch toxische werking moet hebben: pentachloorbenzeen. De stof blijkt een veel hogere toxiciteit voor Guppy's te vertonen als in de testen met de cellijnen is gevonden: LC-50: 0.54  $\mu\text{M}$  en EC-10 23.4 - 550  $\mu\text{M}$ . De toxiciteitstesten met deze stof bleken ook wat moeilijker uit te voeren. De concentratierange waarover de stof toxiciteit vertoont ligt voor een deel boven de oplosbaarheid van pentachloorbenzeen. Hierdoor kan er geen volledige concentratie/effect curve worden geplot. Vanaf ongeveer 400  $\mu\text{M}$  moet de curve worden geëxtrapoleerd. De gevonden EC-10 waarden zijn dus vaak wel gevonden door interpolatie van de berekende curve, maar EC-50 waarden niet. Verder is het natuurlijk maar de vraag of de concentratie pentachloorbenzeen in de wells niet veel verschilt van de nominale concentratie. A-polaire stoffen zullen zich zeker verdelen tussen de waterfase in een microtiterplaat en de wand van de wells die, hoewel behandeld voor celkweek en dus minder hydrofoob dan polystyreen, zeker hydrofobe gedeeltes zal bevatten. Metingen van de concentratie pentachloorbenzeen in de supernatanten van de wells tijdens en direct na een blootstelling hadden hier inzicht in kunnen geven. Dit probleem geldt natuurlijk niet alleen voor pentachloorbenzeen in dit project maar ook voor ethylparathion en benzo[a]pyreen. Ook voor deze stoffen geldt dat de nominale concentratie hoger zal zijn dan de werkelijke concentratie tijdens de test.

Ethylparathion, een stof met een zeer specifieke toxische werking blijkt bij contact met de drie cellijnen een zelfde toxiciteit te vertonen als de narcotiserende stoffen 3,4 dichlooraniline en pentachloorbenzeen. De toxische werking van deze stof op organismen: directe en irreversibele remming van acetylcholineesterase heeft op deze cellen geen effect. Als ze al het

enzym zouden produceren hebben ze het duidelijk niet nodig voor hun functioneren en dientengevolge heeft remming van het enzym ook geen effect op de cellen. Het gebrek aan toxiciteit van deze stof geeft ook een probleem aan dat moet worden opgelost als we vis cellijnen willen gebruiken voor het testen van stoffen of milieumonsters. Bij het testen van zeer specifiek toxische stoffen moet de keuze van de cellijn afhankelijk zijn van de target van de toxische werking. Anders zien we geen effect.

De laatste geteste stof: benzo[a]pyreen is voor de cellijnen duidelijk toxisch te noemen: de EC-10 ligt tussen 0.45 en 2.18  $\mu\text{M}$ . Ook van deze stof is geprobeerd in een pilotexperiment de toxiciteit voor Guppy's vast te stellen. De hoogst geteste concentratie gaf ook hier geen sterfte. De LC-50 is voor het gemak ook hier op deze hoogste concentratie gesteld: 396  $\mu\text{M}$ . Dit ligt dus veel hoger dan de effectconcentraties voor de cellijnen. Opvallend is dat benzo[a]pyreen toxisch is voor RTH-149. Het is zelfs de gevoeligste cellijn van de drie. Babich et al (1989) testten de toxiciteit van benzo[a]pyreen en een aantal metabolieten van de stof samen met een aantal andere PAK's met RTH-149 en vonden vrijwel geen toxiciteit van B[a]P. De metabolieten bleken wel toxisch. Zij verklaarden het gebrek aan toxiciteit doordat RTH-149 geen aryl-hydrocarbon-hydroxylase bevat, waardoor B[a]P niet kan worden omgezet in toxische metabolieten. Op ons laboratorium werd in verschillende experimenten gevonden dat RTH-149 na stimulatie met B[a]P maar ook na stimulatie met  $\beta$ -nafto-flavone geen EROD (7-ethoxy resorufine O-deethylase) activiteit vertoont, terwijl bijvoorbeeld RTG-2 dit wel doet. Ook dit toont aan dat RTH-149 niet beschikt over een intact P450 mixed function oxidase (MFO) systeem. Hoewel dit natuurlijk niet wil zeggen dat er helemaal geen metabole activatie van benzo[a]pyreen kan plaatsvinden zal in ieder geval de omzetting naar bekende toxische metabolieten geremd zijn. Het is dan ook niet te verklaren waarom benzo[a]pyreen dezelfde toxiciteit voor RTH-149 heeft als voor RTG-2 terwijl eerdere onderzoekers hier juist een verschil vonden.

Als we de resultaten van de testen met de drie cellijnen over het algemeen bekijken blijkt RTH-149 de meest gevoelige cellijn te zijn, al is dit zeker niet bij iedere stof het geval. Voor pentachloorbenzeen is RTH-149 juist de minst gevoelige lijn.

### Testen met effluenten

De 18 effluenten kwamen van 4 verschillende bedrijven. Onbekend is of de samenstelling van de effluenten sterk varieert. Aangezien de toxiciteit van de effluenten voor Guppy en Daphnia sterk varieert (ook van de effluenten van dezelfde bedrijven) is er vanuit gegaan dat de waarnemingen als onafhankelijk kunnen worden gezien.

Uit de gemiddelde ranking blijkt de meest simpele van de drie kleurmethoden, de kristalvioletkleuring ook de gevoeligste te zijn. Aangezien het uitvoeren van de overige twee kleuringen naast deze kleuring niet veel meer extra werk betekent als de blootstelling toch al is ingezet is ervoor gekozen om de effluenten te testen met alledrie de kleuringen. Uit tabel 5 kan worden afgeleid dat de kristalvioletkleuring in de testen met effluenten niet de meest gevoelige kleuring is van de drie maar juist de minst gevoelige. In deze reeks testen blijkt de MTT kleuring het eerst te reageren bij toxische effecten.

Een aantal effluenten bleek een nog niet goed verklaard effect te brengen in RTH-149. Dit effect was vooral goed te zien in de neutraalrood kleuring. De cellen ontwikkelden gedurende de blootstelling aan de effluenten grote vacuoleachtige lysosomen. Uit de kristalvioletkleuring en de MTT kleuring kon worden afgelezen dat deze effluenten geen hoge toxiciteit vertoonden. Dezelfde effluenten bleken in de testen met Guppy's en Daphnia's juist wel een hoge toxiciteit te geven. Bij controle naar de herkomst van de effluenten bleek dat deze allen afkomstig waren van één bedrijf en dat ze allen een lage geleidbaarheid hadden.

De geleidbaarheid van de effluenten staat in bijlage 6.2.

Het feit dat de effluenten een lage geleidbaarheid hadden, dus weinig opgeloste zouten bevatten, betekent dat de osmolariteit van de effluenten, na toevoeging van het 10 x

geconcentreerde medium en de overige toevoegingen waarschijnlijk niet veel verschilt van de ideale 320 mOsm/l. Het gesignaleerde effect, dat een gevolg zou kunnen zijn van hypoosmolariteit is hiermee dus niet verklaard. Mogelijk bevatten de effluenten van dit bedrijf stoffen die dit effect veroorzaken. Het verdient aanbeveling zoete effluenten van andere bedrijven die wel en niet toxisch zijn te testen met de cellijnen.

Veel van de overige geteste effluenten bevatten juist vrij veel zout. De osmolariteit van de effluenten is niet gemeten maar een hoge zoutconcentratie zou betekenen dat de hoogste geteste concentraties effluent: 71.1 % en 40.5 % een vrij hoge osmolariteit hebben. In een pilotexperiment is daarom eens bekeken wat de gevoeligheid van de cellijn voor een hoge osmolariteit is. Hieruit bleek dat de cellijn vanaf een osmolariteit van ongeveer 450 mOsm/l toxische effecten vertoont, dus een een duidelijk verlaagde kristalviolet, neutraalrood of MTT kleuring na 3 dagen blootstelling. Dit zou ten eerste betekenen dat we, willen we cellijnen gebruiken voor de beoordeling van effluenten, eerst van effluenten de osmolariteit moeten bepalen en deze vervolgens aanpassen naar 320 mOsm/l voordat we een verdunningsreeks testen. Ten tweede betekent het dat in deze studie EC-10 waarden van 40% en hoger voor effluenten die een hoge geleidbaarheid hebben mogelijk alleen toe te schrijven zijn aan de hoge osmolariteit.

Als we dan vervolgens de uitslagen van de cytotoxiciteitstesten herbeoordelen en de effluenten die in de cellijnen een EC-10 hebben van 40% of hoger niet toxisch noemen en een EC-10 van <40% toxisch en deze scores vergelijken met de beoordelingen van de testen met Guppy's blijkt dat van de 11 in de vittesten toxische effluenten er 10 toxisch in de cellijntesten werden beoordeeld met als criterium dat het effluent in één van de drie kleuringen een EC-10 < 40% heeft. Het in de Guppytest toxische effluent dat in de cellijnen niet toxisch was blijkt één van de 4 afwijkende effluenten te zijn. In de cellijnen werden van de 18 effluenten er 15 beoordeeld als toxisch. Van de in de Guppytest niet toxisch beoordeelde effluenten werden er slechts twee met de cellijnen als niet toxisch beoordeeld. Hieruit volgt dat de sensitiviteit van de cellijnen t.o.v. de Guppytest 91% is en de specificiteit 28.6%. Uitgaande van een prevalentie van ongeveer 61% toxische effluenten (in de Guppytesten) komen we dan uit op een positief voorspellende waarde van ongeveer 67%. Wanneer we als criterium nemen dat een effluent toxisch is als in twee van de drie kleuringen de EC-10 kleiner is dan 40%, vinden we van de 18 effluenten er 11 positief. Van de 11 in de Guppytesten positieve effluenten zijn er dan 8 positief met RTH-149 en van de 7 negatieve effluenten zijn er dan 4 negatief met RTH-149. Hieruit volgen een sensitiviteit van 73%, een specificiteit van 57% en met een prevalentie van 61 een positief voorspellende waarde van 73%. Deze waarden zijn vergelijkbaar met de waarden die Gagné et al (1997) vond bij de evaluatie van het gebruik van vishepatocyten bij de beoordeling van afvalwater.

Gezien de in onze ogen toch wat lage specificiteit (dus het voorkomen van een aantal effluenten die in vitro als toxisch werden beoordeeld maar dat in vivo niet waren) zijn de cellijnen beter als prescreening te gebruiken dan als vervanging van Guppytesten. De te testen effluenten zouden dan eerst met RTH-149 getest worden met de drie kleuringen als eindpuntsmeting. Direct na de blootstelling van de cellen is microscopische beoordeling van de cellen nuttig. Bij vaststelling van cytotoxiciteit is dan een Guppytest noodzakelijk om de toxiciteit voor vissen te bevestigen.

Microscopische beoordeling van de cellen na blootstellen is aan te raden om morfologische effecten op de cellen vast te stellen die mogelijk met de kleuringen niet worden gedetecteerd. De vorming van vacuoles is één van die mogelijke effecten. Bij pilotexperimenten in een ander project waarbij de toxiciteit van influent is vergeleken met de toxiciteit in zebravissen werd af en toe vastgesteld dat de monsters bij bepaalde concentraties duidelijk toxisch waren (wat te zien was aan duidelijke celsterfte) terwijl de verwachte afname in kleuring uitbleef; waarschijnlijk door een interactie van stoffen in de monsters met de kleurstoffen.



### Testen met oppervlaktewaterconcentraten:

Er zijn slechts 8 concentraten getest. Deze concentraten waren enige jaren bij -20°C bewaard. Er was te weinig concentraat om te controleren of de toen gevonden toxiciteit voor *Daphnia magna* nog ongeveer gelijk gebleven is.

Er zijn een aantal concentraten, die in de geteste concentratiereeks geen toxiciteit vertonen met de MTT kleuring, terwijl ze met de KV en de NR kleuringen wel degelijk een normale concentratie/effect curve vertonen. Hiervoor is nog geen verklaring gevonden. Tijdens de testen was er geen afwijkende morfologie van de cellen te zien. Ook was er geen precipitaat tijdens de MTT kleuring waar te nemen, wat de uiteindelijk gevonden absorpties zou kunnen hebben verstoord. Afgezien van deze 'uitbijters' is de correlatie tussen de verschillende kleuringen en de LC-50 voor *Daphnia* niet zo goed en zijn de cytotoxiciteitstesten duidelijk minder gevoelig. Aangezien het niet zeker is of de toxiciteit van de concentraten gedurende de opslag bij -20°C gelijk is gebleven zou voor een goede vergelijking tussen de twee methoden gebruik gemaakt moeten worden van concentraten van recentere datum.

Samenvattend kan gesteld worden dat voor het beoordelen van directe toxiciteit van stoffen viscellijnen goed bruikbaar zijn. De gevoeligheid van de cellijnen ligt voor metalen en organische stoffen in dezelfde ordegrootte als Guppy's. Voor stoffen met een hoge Kow is een acute cytotoxiciteitstest niet geschikt. Ook stoffen met een zeer specifieke toxische werking kunnen niet getest worden met een niet specifieke cellijn.

Voor het beoordelen van effluenten verdient het nog aanbeveling om een aantal effluenten van verschillende oorsprong en verschillende zoutgehaltes te vergelijken voordat een duidelijk beeld van de bruikbaarheid van de cellijnen ontstaat. Vooralsnog zijn in ieder geval de toxiciteiten van effluenten van zoute oorsprong goed gecorreleerd met de uitslagen in de guppientesten. Voorlopig kan worden gesteld dat vis cellijnen goed kunnen worden gebruikt als instrument voor de prescreening van effluenten.

De bruikbaarheid van vis cellijnen voor het beoordelen van oppervlaktewaterconcentraten moet nog eens worden bekeken met een reeks concentraten van recente datum. Er is echter wel een duidelijke correlatie tussen de toxiciteit van concentraten voor *Daphnia* en voor vis cellijnen.

## 5 Literatuur:

Babich H., Martin-Alguacil N. and Borenfreund E., Use of the Rainbow Trout hepatoma cell line RTH-149, in a cytotoxicity assay, *Alternatives to Laboratory Animals*, 17: 67 - 71 (1989)

Babich H. and Borenfreund E., Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review, *Toxicology in Vitro*, 5: 91-100 (1991)

Baksi S.M. and Frazier J.M., Isolated fish hepatocytes - model systems for toxicology research, *Aquatic Toxicology*, 16: 229-256 (1990)

Borenfreund E. and J.A. Puerner, Toxicity determines in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicological letters*, 24: 119-124 (1985)

Driever W. and Rangini Z., Characterization of a cell line derived from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo's, *In vitro Cellular and Developmental Biology of animals*, 29A, 749-754 (1993)

Fryer J.L. et al, *Fish Pathology*, 15: 193-200 (1981)

Gagné F. and Blaise, Evaluation of cell viability, mixed function oxidase activity, metallothionein induction and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes exposed to industrial effluents: Validation of the rainbow trout hepatocyte model for ecotoxicity testing of industrial wastewater, *Environmental Toxicology and Water Quality*, 12: 305-314 (1997)

Halder m., Ahna W., Evaluation of waste water toxicity with three cytotoxicity tests, *Z. Wasser Abwasser Forsch.*, 23: 233 - 236 (1990)

Hasspieler B.M., Haffner G.D. and Adeli K., In vitro toxicological methods for environmental health testing. *Reviews on environmental health*, 11: 213 - 227 (1996)

Huuskonen S.E., Ristola T. E., Tuvikene A., Hahn M. E., Kukkonen J. V. K. and Lindström-Seppä P, Comparison of two bioassays, a fish liver cell line (PLHC-1) and an midge (*Chironomus riparius*), in monitoring freshwater sediments, *Aquatic toxicology*, 44: 47-67 (1998)

Hollert H., Dürr M., Erdinger L., Braunbeck T., Cytotoxicity of settling particular matter and sediments of the Neckar river (Germany) during a winter flood, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 528 - 534 (2000)

Lannan C.N., Winton J.R. and Fryer J.L., Fish cell lines: establishment and characterization of new cell lines from salmonids, *In Vitro*, 20: 671-676 (1984)

Lentz D., Segner H. and Wilfried Hanke, Comparison of different endpoint methods for acute acute cytotoxicity tests with the R1 cell line. *Fish ecotoxicology and ecophysiology* 93 - 102 (1993)

Maas J.L. and Tuk K., DNA-damage of surface water from Rhine and Meuse to crustacea. RIZA werkdokument WSCE 99-11. November 1999

Mossman et al, *Journal of Immunological methods* 65: 55-61 (1983)



Noordsij A., van Beveren J. and Brandt A., Isolation of organic compounds from water for chemical analysis and toxicological testing. *Int. J. envir. Analyt. Chem.* 13: 203-217 (1983)

Pesonen M. and Andersson T.B., Fish primary hepatocyte culture: an important models for xenobiotic metabolism and toxicity studies, *Aquatic Toxicology*, 37: 253-267 (1997)

Pollenz R.S. and Necela B., Characterization of two continuous cell lines derived from *Oncorhynchus mykiss* for models of aryl-hydrocarbon-receptor-mediated signal transduction. Direct comparison to the mammalian Hepa-1c1c7 cell line, *Aquatic Toxicology*, 41: 31-49 (1998)

Roex E.W.M., van Gestel C.A.M., van Wezel A.P. and van Straalen N.M. Ratios between acute aquatic toxicity and effects in population growth rates in relation between toxicity in relation to toxicant mode of action. *Environmental toxicology and chemistry*, 19: 685 - 693 (2000)

Sauvant M.P., Pepin D., Bohatier J., Groliere C.A. and Guiliot J., Toxicity assessmnet of 16 inorganic environmental pollutants by six bioassays, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37: 131-140 (1997)

Smolarek T.A., Morgan S.L., Moynihan C.G., Lee H.; Harvey R.G. and Baird W.M., Metabolism and DNA-adduct formation of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in fish cell lines in culture. *Carcinogenesis*, 8: 1501 - 1509 (1987)

Thornton S.C., Diamond L. and Baird W.M., Metabolism of benzo[a]pyrene by fish cell lines in culture. *Journal of toxicology and environmental health*, 10: 157 - 167 (1982)

Villeneuve D.L. Crunkilton R.L. and DeVita W.M., Aryl hyrocarbon receptor-mediated toxic potency of dissolved lipophilic organic contaminants collected from Lincoln creek, Milwaukee, Wisconsin, USA, to PHLC-1 (*Poeciliopsis lucida*) fish hepatoma cells, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 977-984 (1997)

Wolf K. et al, *Science* 135: 1065-? (1962)

## 6 Bijlagen

### 6.1 Gegevens en gemeten toxiciteitsparameters van de 8 stoffen met de drie cellijnen

Concentraties zijn in mg/l, tenzij anders vermeld								
Stof	Cadmium-chloride	Kalium-dichromaat	tributyltin-chloride	4-nitroquinoline 1-oxide	3,4-dichlooraniline	pentachloorbenzeen	ethyl-parathion	3,4-benzopyreen
cas-nr	10108-64-2	7778-50-9	1461-22-9	56-57-5	95-76-1	608-93-5	56-38-2	50-32-8
MW	183,31	294,18	325,49	190,16	162,02	250,34	291,26	252,31
solubility mg/l				2340	93,2	0,65	11	0,0016
gevonden			> 10 mg/l		>1000 mg/l	100< x <320 mg/l	100< x <320 mg/l	10 < x < 32 mg/l
oplosbaarheid								
microtox								
EC50 5 min	98	38,6	0,02	1,09	0,45		8,5	
EC50 15 min	17	26,9	0,0065	0,67	0,56			8,11
EC50 30 min	5,4	16,8		0,61	0,65		8,89	
D. magna								
LC50 48h	0,017	1,81	0,018	0,35	0,229	5,35	0,001	
21d	0,0035	0,379			0,1	0,239	0,00014	
regenboogforel								
LC50 24h	0,94	58,7						
LC50 48h	2,91	218						
LC50 96h	1,3		0,011		1,95	1,44	1,39	
goldfish								
LC50 48h	2,77				22,4	0,268	2,6	
LC50 96h	2,47	37,9					2,6	
Guppy								
LC50 24h	3,34	41,6					0,082	
LC50 48h	2,31	39,7			3,98		0,068	
LC50 96h	1,27	30,1	0,018	100	3,46	0,134	0,055	100
LC50 96h in µM	6,93	102,32	0,06	525,87	21,36	0,54	0,19	396,34
RTG-2								
kristalviolet								
a	0,5522	0,6097	0,5476	0,5461	0,6949	0,718	0,6968	0,61388
b	3,305	0,4815	1,926	2,068	0,9198	0,3549	0,896	3,165
c	6,321	6,08	0,2772	0,246	37,71	2918	208,3	0,4173
d	0,08232	-0,04442	0,0414	0,1219	0,1369	-0,0057	0,01147	0,1914
EC10	3,2513	0,0634	0,0886	0,0850	3,4594	5,9746	17,9342	0,2084
EC50	6,3210	6,0800	0,2772	0,2460	37,7100	2918,0000	208,3000	0,4173
LOEC	10,0000	0,0320	0,2100	0,1000	2,1000	1,0000	4,7000	0,2100
a	0,853	0,7839	0,8469	0,6886	0,6561	0,6701	0,7043	0,6429
b	6,656	0,7649	2,583	1,935	0,9964	1,567	0,6682	2,081
c	8,376	6,857	0,1966	0,2206	56,5	79,54	981,2	0,4044
d	0,08744	-0,03492	0,05385	0,1793	0,1141	-1,583	-0,3669	0,09302
EC10	6,0210	0,3878	0,0840	0,0709	6,2281	19,5714	36,6161	0,1407
EC50	8,3760	6,8570	0,1966	0,2206	56,5000	79,5400	981,2000	0,4044
LOEC	0,3200	0,3200	0,2100	0,1000	1,0000	10,0000	32,0000	0,1000
a	0,5053	0,765	0,6641	0,6252	0,7398	0,7487	0,7362	0,7714
b	12,65	0,6545	2,474	2,083	1,96	1,583	1,5	5,265
c	8,555	8,422	0,2221	0,227	129	46,39	393,9	0,6132
d	0,0572	-0,00383	0,06647	0,1606	-0,0255	0,06737	0,00115	0,1735
EC10	7,1909	0,2934	0,0914	0,0791	2,8519	11,5775	91,0377	0,4040
EC50	8,5550	8,4220	0,2221	0,2270	71,3000	46,3900	393,9000	0,6132
LOEC	10,0000	0,0320	0,0210	0,0470	1,0000		47,0000	0,1000
EC10 gem	5,4878	0,2482	0,0880	0,0783	4,1798	12,3745	48,5293	0,2510
EC10 SD	2,0232	0,1668	0,0037	0,0071	1,7997	6,8333	37,9799	0,1367
EC50 gem	7,7507	7,1197	0,2320	0,2312	55,1700	1014,6433	527,8000	0,4783
EC50 SD	1,2414	1,1929	0,0412	0,0132	16,8344	1648,4386	403,4731	0,1170
LOEC gem.	6,7733	0,1280	0,1470	0,0823	1,3667	5,5000	27,9000	0,1367
LOEC SD	5,5888	0,1663	0,1091	0,0306	0,6351	6,3640	21,4460	0,0635
EC10 µM	29,9370	0,8437	0,2703	0,4118	25,7980	49,4308	166,6186	0,9949
SD EC10 µM	11,0372	0,5672	0,0115	0,0374	11,1078	27,2962	130,3988	0,5419
EC50 µM	42,2817	24,2017	0,7127	1,2158	340,5135	4053,0612	1812,1266	1,8957
SD EC 50 µM	6,7719	4,0550	0,1266	0,0695	103,9035	6584,7989	1385,2677	0,4637
LOEC µM	36,9502	0,4351	0,4516	0,4330	8,4352	21,9701	95,7907	0,5417
SD LOEC µM	30,4880	0,5652	0,3352	0,1609	3,9198	25,4213	73,6317	0,2517

RTG-2 neutraalrood	Cadmium- chloride	Kalium- dichromaat	tributyltin- chloride	4-nitro quinoline 1-oxide	3,4-dichloor aniline	pentachloor- benzeen	ethyl- parathion	3,4-benzo- pyreen
a	0,4455	0,455	0,4123	0,4883	0,277	0,3514	0,3476	0,3274
b	4,584	0,8402	3,949	4,326	1,824	1,758	0,6586	4,414
c	6,247	2,068	0,1147	0,2352	87,7	53,26	253,6	0,3186
d	0,006194	-0,01357	0,08341	0,1083	-0,0049	-0,5841	-0,1128	0,04215
EC10	3,8681	0,1513	0,0658	0,1415	26,2929	15,2615	9,0208	0,1937
EC50	6,2470	2,0680	0,1147	0,2352	87,7000	53,2600	253,6000	0,3186
LOEC	10,0000	0,1000	0,0210	0,0210	2,1000	21,0000	21,0000	0,0210
a	0,5508	0,4858	0,4942	0,3043	0,4606	0,4689	0,4831	0,464
b	9,629	1,351	2,805	2,088	0,7867	1,173	0,7216	13,09
c	7,884	3,98	0,09549	0,1602	99,9	32,31	120,5	0,5097
d	0,1533	0,07578	0,1653	0,01043	-0,0905	0,00598	0,06373	0,1331
EC10	6,2755	0,7826	0,0436	0,0559	6,1177	4,9639	5,7357	0,4309
EC50	7,8840	3,9800	0,0955	0,1602	99,9000	32,3100	120,5000	0,5097
LOEC	10,0000	0,0100	0,0210	0,0210	1,0000	1,0000	1,0000	0,0210
a	0,4838	0,4717	0,2979	0,496	0,3439	0,4846	0,4541	0,2965
b	1,296	0,7385	2,33	3,021	0,7419	1,024	1,56	5,79
c	3,61	2,206	0,07643	0,1417	25,58	56,2	25,9	0,6089
d	-0,00926	-0,0107	-0,002182	0,0318	-0,03825	-0,00255	0,00958	-0,00082
EC10	0,6625	0,1126	0,0298	0,0685	1,3234	6,5744	6,3329	0,4166
EC50	3,6100	2,2060	0,0764	0,1417	25,5800	56,2000	25,9000	0,6089
LOEC	2,1000	0,3200			2,1000	10,0000	18,0000	4,7000
EC10 gem	3,6020	0,3488	0,0464	0,0886	11,2447	8,9333	7,0298	0,3471
EC10 SD	2,8159	0,3762	0,0182	0,0462	13,2508	5,5393	1,7500	0,1330
EC50 gem	5,9137	2,7513	0,0955	0,1790	71,0600	47,2567	133,3333	0,4791
EC50 SD	2,1564	1,0663	0,0191	0,0495	39,8564	13,0274	114,3912	0,1476
LOEC gem.	7,3667	0,1433	0,0210	0,0210	1,7333	10,6667	13,3333	1,5807
LOEC SD	4,5611	0,1595	0,0000	0,0000	0,6351	10,0167	10,7858	2,7014
EC10 µM	19,6500	1,1858	0,1425	0,4662	69,4029	35,6846	24,1358	1,3756
SD EC10 µM	15,3615	1,2787	0,0558	0,2431	81,7848	22,1270	6,0083	0,5273
EC50 µM	32,2605	9,3526	0,2935	0,9415	438,5878	188,7699	457,7811	1,8987
SD EC 50 µM	11,7637	3,6246	0,0588	0,2604	245,9968	52,0388	392,7460	0,5848
LOEC µM	40,1869	0,4872	0,0645	0,1104	10,6983	42,6087	45,7781	6,2648
SD LOEC µM	24,8817	0,5421	0,0000	0,0000	3,9198	40,0122	37,0315	10,7068

RTG-2 MTT	Cadmium-chloride	Kalium-dichromaatt	tributyltin-chloride	4-nitroquinoline 1-oxide	3,4-dichlooraniline	pentachloorbenzeen	ethylparathion	3,4-benzopyreen
a	0,1312	0,1679	0,1555	0,1651	0,1172	0,1292	0,1344	0,1401
b	8,356	0,6888	1,827	2,168	5,829	1,905	1,618	4,416
c	9,091	3,174	0,254	0,222	112,4	28,04	40,25	0,5472
d	0,01029	0,03758	0,005559	0,03312	0,00994	0,00702	0,02717	0,01171
EC 10	6,9890	0,1307	0,0763	0,0806	77,1009	8,8483	10,3513	0,3327
EC-50	9,0910	3,1740	0,2540	0,2220	112,4000	28,0400	40,2500	0,5472
LOEC	10,0000	0,0100	0,0210	0,1000	1,0000	10,0000	47,0000	0,0047
a	0,171	0,1735	0,1699	0,2623	0,1503	0,2122	0,233	0,17
b	4,036	0,7171	1,747	0,7785	4,051	1,305	1,135	3,158
c	7,897	2,92	0,192	0,3734	117,8	29,78	31,13	0,9025
d	0,01476	-0,001405	0,009776	-0,00713	-0,0016	0,04918	0,04832	0,01064
EC 10	4,5817	0,1364	0,0546	0,0222	68,4837	5,5297	4,4919	0,4501
EC-50	7,8970	2,9200	0,1920	0,3734	117,8000	29,7800	31,1300	0,9025
LOEC	10,0000	0,0320	0,0100	0,0210	100,0000	32,0000	21,0000	0,1000
a	0,2503	0,2526	0,2333	0,1913	0,1434	0,2037	0,2065	0,1636
b	8,208	0,7129	1,383	1,832	4,119	1,242	0,9932	3,51
c	10,14	3,096	0,2546	0,2215	119,4	39,69	62,95	0,7235
d	0,01318	-0,00363	-0,00385	0,02623	-0,00115	0,00822	0,00369	0,00973
EC 10	7,7585	0,1420	0,0520	0,0668	70,0382	6,7665	6,8899	0,3869
EC-50	10,1400	3,0960	0,2546	0,2215	119,4000	39,6900	62,9500	0,7235
LOEC	10,0000	0,1000		0,0100	10,0000	0,3200	0,3200	0,4700
EC10 gem	6,4431	0,1363	0,0610	0,0565	71,8742	7,0482	7,2444	0,3899
EC10 SD	1,6573	0,0057	0,0134	0,0305	4,5927	1,6771	2,9457	0,0587
EC50 gem	9,0427	3,0633	0,2335	0,2723	116,5333	32,5033	44,7767	0,7244
EC50 SD	1,1223	0,1301	0,0360	0,0876	3,6679	6,2843	16,3859	0,1777
LOEC gem.	10,0000	0,0473	0,0155	0,0437	37,0000	14,1067	22,7733	0,1916
LOEC SD	0,0000	0,0469	0,0078	0,0491	54,7449	16,2344	23,3905	0,2458
EC10 µM	35,1485	0,4635	0,1873	0,2972	443,6134	28,1544	24,8726	1,5453
SD EC10 µM	9,0408	0,0192	0,0410	0,1604	28,3463	6,6995	10,1138	0,2328
EC50 µM	49,3299	10,4131	0,7175	1,4320	719,2528	129,8368	153,7343	2,8711
SD EC 50 µM	6,1223	0,4423	0,1105	0,4604	22,6384	25,1033	56,2585	0,7041
LOEC µM	54,5524	0,1609	0,0476	0,2296	228,3669	56,3500	78,1890	0,7593
SD LOEC µM	0,0000	0,1595	0,0239	0,2582	337,8895	64,8492	80,3079	0,9742

RTH-149 kristalviolet	Cadmium- chloride	Kalium- dichromaat	tributyltin- chloride	4-nitro quinoline 1-oxide	3,4-dichloor aniline	pentachloor- benzeen	ethyl- parathion	3,4-benzo- pyreen
a	0,4595	0,4428	0,42	0,4812	0,4828	0,6377	0,7364	0,5788
b	0,7333	2,998	3,021	1,3	0,5264	0,4025	0,3228	2,187
c	3,696	3,595	0,08626	0,04873	22,15	2322	2122	0,5332
d	0,08019	0,05788	0,05751	0,06685	0,2453	-0,1066	-0,6848	0,1485
EC10	0,1847	1,7274	0,0417	0,0090	0,3409	9,8870	2,3474	0,1952
EC50	3,6960	3,5950	0,0863	0,0487	22,1500	2322,0000	2122,0000	0,5332
LOEC	0,2100	0,2100	0,0100	0,0210	10,0000	10,0000	4,7000	0,1000
a	0,3987	0,4565	0,6485	0,6479	0,6783	0,7789	0,7248	0,7951
b	2,848	0,4859	1,075	1,057	0,7487	0,5027	0,4342	2,314
c	4,79	18,59	0,1289	0,059	36,69	3151	2063	0,4198
d	0,0488	0,00763	0,02468	0,0648	0,05768	0,4371	-0,5029	0,2405
EC10	2,2145	0,2020	0,0167	0,0074	1,9499	39,8295	13,0854	0,1624
EC50	4,7900	18,5900	0,1289	0,0590	36,6900	3151,0000	2063,0000	0,4198
LOEC	0,0500	1,6000	0,0500	0,0016	3,2000	10,0000	1,0000	0,1000
a	0,6686	0,7605	0,6769	0,6904	0,7955	0,5234	0,6764	0,8076
b	8,044	0,4648	1,65	1,308	1,69	2,14	0,905	4,036
c	3,376	7,903	0,1956	0,1421	92,49	108,4	24,59	0,2127
d	0,1132	0,03945	0,04331	0,08705	0,119	0,3323	0,248	0,2408
EC10	2,5691	0,0699	0,0516	0,0265	25,2030	38,8257	2,1694	0,1234
EC50	3,3760	7,9030	0,1956	0,1421	92,4900	108,4000	24,5900	0,2127
LOEC	2,1000	1,9000	0,0047	0,0021	1,0000	10,0000	4,7000	0,0210
EC10 gem	1,6561	0,6665	0,0367	0,0143	9,1646	29,5141	5,8674	0,1604
EC10 SD	1,2865	0,9212	0,0180	0,0106	13,9129	17,0050	6,2516	0,0360
EC50 gem	3,9540	10,0293	0,1369	0,0833	50,4433	1860,4667	1403,1967	0,3886
EC50 SD	0,7415	7,7203	0,0551	0,0512	37,1321	1572,9315	1194,2728	0,1625
LOEC gem.	0,7867	1,2367	0,0216	0,0082	4,7333	10,0000	3,4667	0,0737
LOEC SD	1,1402	0,9017	0,0248	0,0111	4,6918	0,0000	2,1362	0,0456
EC10 $\mu$ M	9,0343	2,2655	0,1127	0,0751	56,5645	117,8959	20,1449	0,6356
SD EC10 $\mu$ M	7,0184	3,1314	0,0553	0,0557	85,8717	67,9276	21,4639	0,1425
EC50 $\mu$ M	21,5700	34,0925	0,4207	0,4379	311,3402	7431,7595	4817,6772	1,5400
SD EC 50 $\mu$ M	4,0449	26,2436	0,1693	0,2693	229,1823	6283,1808	4100,3667	0,6441
LOEC $\mu$ M	4,2915	4,2038	0,0663	0,0433	29,2145	39,9457	11,9023	0,2920
SD LOEC $\mu$ M	6,2200	3,0651	0,0761	0,0582	28,9584	0,0000	7,3343	0,1808

RTH-149 neutraalrood	Cadmium- chloride	Kalium- dichromaat	tributyltin- chloride	4-nitro quinoline 1-oxide	3,4-dichloor aniline	pentachloor- benzeen	ethyl- parathion	3,4-benzo- pyreen
a	0,2996	0,3208	0,2914	0,2984	0,3085	0,4002	0,4979	0,2747
b	3,665	0,7946	5,169	1,842	1,84	3,222	0,7099	2,155
c	4,5	7,824	0,1229	0,1031	53,55	480,8	19,81	0,3094
d	0,00459	0,03505	0,00968	0,03718	-0,02676	0,184	0,06495	-0,00816
EC10	2,4708	0,4926	0,0803	0,0313	16,2236	243,1076	0,8968	0,1116
EC50	4,5000	7,8240	0,1229	0,1031	53,5500	480,8000	19,8100	0,3094
LOEC	5,4000	0,9000	0,1000	0,0470	21,0000	10,0000	10,0000	0,0210
a	0,3507	0,3747	0,1792	0,1971	0,4097	0,2629	0,2876	0,386
b	3,071	0,9073	1,802	0,8307	1,35	14,37	0,9087	3,203
c	4,764	5,542	0,1581	0,2323	66,95	185,1	34,46	0,1535
d	0,01081	0,00798	0,00699	0,00632	-0,04146	0,1316	0,05396	0,01481
EC10	2,3294	0,4920	0,0467	0,0165	13,1493	158,8550	3,0704	0,0773
EC50	4,7640	5,5420	0,1581	0,2323	66,9500	185,1000	34,4600	0,1535
LOEC	4,7000	1,0000	0,0210	0,0470	10,0000	4,7000	4,7000	0,0100
a	0,2684	0,2718	0,2564	0,253	0,3294	0,3656	0,3414	0,3218
b	4,002	0,848	3,731	1,852	1,297	0,9516	2,638	1,881
c	3,547	3,424	0,1224	0,139	56,23	115,5	36,52	0,4891
d	0,01005	0,00925	0,00725	0,00962	-0,02272	-0,00286	0,126	0,00301
EC10	2,0484	0,2566	0,0679	0,0424	10,3332	11,4763	15,8781	0,1521
EC50	3,5470	3,4240	0,1224	0,1390	56,2300	115,5000	36,5200	0,4891
LOEC	2,1000	1,0000	0,0470	0,0470	10,0000	210,0000	10,0000	0,1000
EC10 gem	2,2829	0,4137	0,0650	0,0301	13,2353	137,8129	6,6151	0,1137
EC10 SD	0,2150	0,1361	0,0170	0,0130	2,9461	117,2405	8,0953	0,0374
EC50 gem	4,2703	5,5967	0,1345	0,1581	58,9100	260,4667	30,2633	0,3173
EC50 SD	0,6402	2,2005	0,0205	0,0667	7,0906	193,9617	9,1113	0,1679
LOEC gem.	4,0667	0,9667	0,0560	0,0470	13,6667	74,9000	8,2333	0,0437
LOEC SD	1,7388	0,0577	0,0403	0,0000	6,3509	117,0300	3,0600	0,0491
EC10 $\mu$ M	12,4537	1,4064	0,1997	0,1581	81,6896	550,5031	22,7120	0,4505
SD EC10 $\mu$ M	1,1730	0,4626	0,0523	0,0684	18,1839	468,3252	27,7941	0,1484
EC50 $\mu$ M	23,2957	19,0246	0,4131	0,8316	363,5971	1040,4517	103,9049	1,2577
SD EC 50 $\mu$ M	3,4923	7,4801	0,0629	0,3507	43,7638	774,7929	31,2822	0,6656
LOEC $\mu$ M	22,1846	3,2860	0,1720	0,2472	84,3517	299,1931	28,2680	0,1731
SD LOEC $\mu$ M	9,4854	0,1963	0,1237	0,0000	39,1980	467,4844	10,5059	0,1946

RTH-149 MTT	Cadmium-chloride	Kalium-dichromaat	tributyltin-chloride	4-nitroquinoline 1-oxide	3,4-dichlooraniline	pentachloorbenzeen	ethylparathion	3,4-benzopyreen
a	0,2091	0,1982	0,1993	0,2054	0,1684	0,1439	0,1478	0,1689
b	2,349	0,773	1,448	1,654	1,008	1,351	2,986	3,287
c	5,197	4,066	0,1456	0,1019	74,28	576	16,87	0,6444
d	0,01259	0,01714	0,01169	0,07235	-0,0213	-0,00192	0,07757	0,0069
EC10	2,0395	0,2370	0,0319	0,0270	8,3984	113,2651	8,0824	0,3303
EC50	5,1970	4,0660	0,1456	0,1019	74,2800	576,0000	16,8700	0,6444
LOEC	2,4000	0,4700	0,0100	0,0470	1,0000	4,7000	21,0000	0,4700
a	0,1859	0,1822	0,3363	0,3736	0,1757	0,1179	0,1425	0,1816
b	7,153	0,8757	3,272	1,146	0,9819	10,2	0,8729	2,825
c	3,846	4,214	0,1369	0,1319	18,42	111,3	49,07	0,214
d	0,03439	0,01808	0,0888	0,00617	-0,00072	0,06149	-0,01027	0,04389
EC10	2,8288	0,3428	0,0699	0,0194	1,9654	89,7308	3,9594	0,0983
EC50	3,8460	4,2140	0,1369	0,1319	18,4200	111,3000	49,0700	0,2140
LOEC	4,7000	0,2100	0,0470	0,1000	4,7000	21,0000	4,7000	1,0000
a	0,1196	0,1099	0,1161	0,1121	0,1322	0,1362	0,148	0,1506
b	3,14	0,993	1,366	1,37	3,456	13,66	3,037	2,421
c	4,291	2,856	0,2195	0,1819	115,1	184,7	20,52	1,37
d	0,00334	0,00669	-0,00072	0,00545	0,0058	0,07164	-5,00E-10	0,02273
EC10	2,1314	0,3125	0,0439	0,0366	60,9484	157,2570	9,9534	0,5528
EC50	4,2910	2,8560	0,2195	0,1819	115,1000	184,7000	20,5200	1,3700
LOEC		0,3200	0,1000	0,0470	2,1000		4,7000	0,2100
EC10 gem	2,3332	0,2974	0,0486	0,0277	23,7707	120,0843	7,3317	0,3271
EC10 SD	0,4317	0,0545	0,0194	0,0086	32,3571	34,2757	3,0667	0,2273
EC50 gem	4,4447	3,7120	0,1673	0,1386	69,2667	290,6667	28,8200	0,7428
EC50 SD	0,6885	0,7450	0,0454	0,0404	48,5346	249,8164	17,6317	0,5842
LOEC gem.	3,5500	0,3333	0,0523	0,0647	2,6000	12,8500	10,1333	0,5600
LOEC SD	1,6263	0,1305	0,0452	0,0306	1,9000	11,5258	9,4108	0,4026
EC10 $\mu$ M	12,7283	1,0109	0,1493	0,1454	146,7149	479,6848	25,1724	1,2965
SD EC10 $\mu$ M	2,3548	0,1852	0,0597	0,0453	199,7102	136,9165	10,5291	0,9007
EC50 $\mu$ M	24,2467	12,6181	0,5141	0,7287	427,5192	1161,0876	98,9494	2,9440
SD EC 50 $\mu$ M	3,7558	2,5325	0,1394	0,2125	299,5592	997,9084	60,5360	2,3156
LOEC $\mu$ M	19,3661	1,1331	0,1608	0,3401	16,0474	51,3302	34,7914	2,2195
SD LOEC $\mu$ M	8,8721	0,4436	0,1390	0,1609	11,7269	46,0407	32,3107	1,5957

## Toepassing van vis cellijnen bij de beoordeling van de toxiciteit van stoffen en effluënten

ZF-4 kristalviolet	Cadmium-chloride	Kalium-dichromaat	tributyltin-chloride	4-nitro quinoline 1-oxide	3,4-dichloor aniline	pentachloor-benzeen	ethyl-parathion	3,4-benzo-pyreen
a	0,3625	0,3984	0,3859	0,3352	0,4303	0,451	0,4073	0,4159
b	2,338	1,354	2,044	9,041	1,374	2,732	1,204	1,02
c	4,76	1,511	0,111	0,05147	55,26	17,16	150,9	4,487
d	0,05426	0,05715	0,06569	0,06525	0,07665	0,05	0,0156	-0,00909
EC10	1,8598	0,2982	0,0379	0,0404	11,1663	7,6777	24,3291	0,5205
EC50	4,7600	1,5110	0,1110	0,0515	55,2600	17,1600	150,9000	4,4870
LOEC	0,2100	0,0320	0,0100	0,0100	21,0000	10,0000	47,0000	0,0210
a	0,4625	0,5217	0,5425	0,4956	0,5366	0,5577	0,5315	0,5226
b	3,232	1,496	2,615	7,417	0,9015	1,9	2,936	0,8868
c	5,591	2,114	0,1302	0,09351	71,24	22,48	22,48	6,448
d	0,04035	0,03765	0,04396	0,056	-0,01914	0,04995	0,05005	-0,01096
EC10	2,8330	0,4867	0,0562	0,0695	6,2261	7,0723	10,6360	0,5412
EC50	5,5910	2,1140	0,1302	0,0935	71,2400	22,4800	22,4800	6,4480
LOEC	4,7000	0,0320	0,0047	0,0021	3,2000	10,0000	18,0000	0,2100
a	0,5764	0,6127	0,6252	0,6604	0,5703	0,5775	0,6077	0,6155
b	11,23	2,849	14,8	2,301	2,513	2,937	1,803	0,6909
c	2,704	3,815	0,1583	0,3226	126	22,02	29,82	6,471
d	0,08187	0,0811	0,06141	0,0312	0,03149	0,07005	0,06966	0,04399
EC10	2,2235	1,7642	0,1365	0,1242	52,5589	10,4211	8,8156	0,2690
EC50	2,7040	3,8150	0,1583	0,3226	126,0000	22,0200	29,8200	6,4710
LOEC	4,7000	3,2000	0,0210	0,1000	100,0000	18,0000	32,0000	
EC10 gem	2,3054	0,8497	0,0768	0,0780	23,3171	8,3904	14,5936	0,4436
EC10 SD	0,4917	0,7976	0,0524	0,0425	25,4443	1,7845	8,4802	0,1515
EC50 gem	4,3517	2,4800	0,1332	0,1559	84,1667	20,5533	67,7333	5,8020
EC50 SD	1,4862	1,1948	0,0238	0,1459	37,0993	2,9477	72,1179	1,1389
LOEC gem.	3,2033	1,0880	0,0119	0,0374	41,4000	12,6667	32,3333	0,1155
LOEC SD	2,5923	1,8290	0,0083	0,0544	51,5236	4,6188	14,5029	0,1336
EC10 $\mu$ M	12,5765	2,8884	0,2361	0,4103	143,9148	33,5159	50,1050	1,7581
SD EC10 $\mu$ M	2,6825	2,7112	0,1611	0,2237	157,0445	7,1283	29,1155	0,6005
EC50 $\mu$ M	23,7394	8,4302	0,4091	0,8196	519,4832	82,1017	232,5528	22,9955
SD EC 50 $\mu$ M	8,1075	4,0615	0,0731	0,7674	228,9800	11,7748	247,6066	4,5138
LOEC $\mu$ M	17,4750	3,6984	0,0366	0,1965	255,5240	50,5979	111,0119	0,4578
SD LOEC $\mu$ M	14,1416	6,2174	0,0255	0,2860	318,0076	18,4501	49,7936	0,5297



ZF-4 Neutraalrood	Cadmium-chloride	Kalium-dichromaatt	tributyltin-chloride	4-nitroquinoline 1-oxide	3,4-dichlooraniline	pentachloorbenzeen	ethylparathion	3,4-benzopyreen
a	0,1044	0,188	0,1179	0,1017	0,1381	0,126	0,1138	0,1359
b	3,431	9,521	8,363	7,885	1,063	2,464	2,061	2,052
c	3,48	2,578	0,1537	0,5238	48,05	12,74	89,47	1,483
d	0,01061	0,00921	0,00987	0,00871	0,00514	0,05	0,017	0,000003
EC10	1,8342	2,0467	0,1182	0,3964	6,0814	5,2227	30,8089	0,5083
EC50	3,4800	2,5780	0,1537	0,5238	48,0500	12,7400	89,4700	1,4830
LOEC	2,1000	3,2000	0,1000	0,0100	21,0000	210,0000	4,7000	1,0000
a	0,1679	0,1696	0,1896	0,1747	0,1941	0,1902	0,1911	0,1836
b	13,74	4,542	7,487	3,239	0,5732	2,039	2,078	1,969
c	4,616	2,768	0,1194	0,07166	90,67	17,54	17,94	1,524
d	0,01433	0,01326	0,00955	0,01092	-0,06825	0,0102	0,0102	0,00003
EC10	3,9338	1,7064	0,0890	0,0364	1,9620	5,9708	6,2317	0,4993
EC50	4,6160	2,7680	0,1194	0,0717	90,6700	17,5400	17,9400	1,5240
LOEC	4,7000	3,2000	0,0100	0,0470	10,0000	10,0000	10,0000	0,4700
a	0,1187	0,1486	0,1601	0,152	0,1503	0,1558	0,1588	0,1968
b	7,118	8,955	9,872	7,958	0,8667	2,486	2,724	1,317
c	4,037	2,746	0,1124	0,0842	54,85	15,44	15,94	1,245
d	0,0123	0,00975	0,01172	0,01063	-0,01558	0,01048	0,05056	0,00013
EC10	2,9648	2,1485	0,0900	0,0639	4,3468	6,3797	7,1150	0,2348
EC50	4,0370	2,7460	0,1124	0,0842	54,8500	15,4400	15,9400	1,2450
LOEC	0,2100	3,2000	0,0047	0,1000	32,0000	10,0000	10,0000	
EC10 gem	2,9110	1,9672	0,0991	0,1656	4,1300	5,8577	14,7185	0,4141
EC10 SD	1,0508	0,2316	0,0166	0,2004	2,0682	0,5867	13,9416	0,1554
EC50 gem	4,0443	2,6973	0,1285	0,2266	64,5233	15,2400	41,1167	1,4173
EC50 SD	0,5680	0,1039	0,0221	0,2575	22,8975	2,4062	41,8872	0,1506
LOEC gem.	2,3367	3,2000	0,0382	0,0523	21,0000	76,6667	8,2333	0,7350
LOEC SD	2,2543	0,0000	0,0536	0,0452	11,0000	115,4701	3,0600	0,3748
EC10 $\mu$ M	15,8800	6,6871	0,3044	0,8706	25,4909	23,3991	50,5340	1,6413
SD EC10 $\mu$ M	5,7326	0,7871	0,0509	1,0539	12,7653	2,3437	47,8666	0,6159
EC50 $\mu$ M	22,0628	9,1690	0,3948	1,1914	398,2430	60,8772	141,1683	5,6174
SD EC 50 $\mu$ M	3,0988	0,3533	0,0679	1,3541	141,3252	9,6119	143,8136	0,5971
LOEC $\mu$ M	12,7471	10,8777	0,1175	0,2752	129,6136	306,2502	28,2680	2,9131
SD LOEC $\mu$ M	12,2979	0,0000	0,1645	0,2379	67,8929	461,2529	10,5059	1,4853

ZF-4 MTT	Cadmium-chloride	Kalium-dichromaatt	tributyltin-chloride	4-nitroquinoline 1-oxide	3,4-dichlooraniline	pentachloor-benzeen	ethyl-parathion	3,4-benzo-pyreen
a	0,1059	0,1082	0,1026	0,1088	0,1086	0,09593	0,1043	0,1027
b	1,444	1,454	6,372	2,265	0,9784	2,02	1,708	2,369
c	2,293	1,181	0,2555	0,04174	69,07	124,4	20,72	1,953
d	0,00176	0,00348	0,00518	0,0064	-0,01703	-0,00071	0,000001	4,00E-06
EC10	0,5007	0,2606	0,1810	0,0158	7,3110	41,9200	5,7240	0,7725
EC50	2,2930	1,1810	0,2555	0,0417	69,0700	124,4000	20,7200	1,9530
LOEC	0,4700	0,3200	0,1000	0,0210	4,7000	10,0000		1,0000
a	0,1015	0,1028	0,1068	0,1535	0,1075	0,1131	0,09634	0,1052
b	0,9853	1,35	5,164	1,153	0,9028	0,8013	10,28	1,283
c	1,227	1,126	0,2413	0,01536	82,65	127,1	11,62	2,654
d	0,00139	0,00178	0,0045	0,0029	-0,02249	-0,03511	0,0000004	-0,00051
EC10	0,1319	0,2212	0,1577	0,0023	7,2486	8,1898	9,3838	0,4788
EC50	1,2270	1,1260	0,2413	0,0154	82,6500	127,1000	11,6200	2,6540
LOEC	2,1000	0,1000	0,2100	0,0100	10,0000	10,0000	10,0000	1,0000
a	0,1757	0,1804	0,2158	0,1974	0,2093	0,2084	0,2028	0,1935
b	2,379	1,535	3,713	2,907	0,6793	1,769	1,725	0,9893
c	5,741	1,322	0,112	0,0786	86,67	20,09	22,99	3,708
d	-0,00075	0,00664	0,00761	0,01159	-0,04858	0,01007	0,00994	-0,00154
EC10	2,280	0,3159	0,06197	0,0369	3,413	5,802	6,432	0,4023
EC50	5,741	1,322	0,112	0,0786	86,67	20,09	22,99	3,708
LOEC	4,7	0,1	0,1	0,021	1	10	10	0,21
EC10 gem	0,9708	0,2659	0,1335	0,0183	5,9908	18,6371	7,1800	0,5512
EC10 SD	1,1485	0,0476	0,0631	0,0175	2,2328	20,1988	1,9412	0,1954
EC50 gem	3,0870	1,2097	0,2029	0,0452	79,4633	90,5300	18,4433	2,7717
EC50 SD	2,3594	0,1011	0,0791	0,0318	9,2226	61,0178	6,0172	0,8834
LOEC gem.	2,4233	0,1733	0,1367	0,0173	5,2333	10,0000	10,0000	0,7367
LOEC SD	2,1335	0,1270	0,0635	0,0064	4,5236	0,0000	0,0000	0,4561
EC10 µM	5,2958	0,9038	0,4103	0,0964	36,9759	74,4473	24,6514	2,1846
SD EC10 µM	6,2651	0,1618	0,1938	0,0918	13,7810	80,6857	6,6647	0,7745
EC50 µM	16,8403	4,1120	0,6235	0,2379	490,4539	361,6282	63,3226	10,9852
SD EC 50 µM	12,8712	0,3437	0,2429	0,1670	56,9225	243,7396	20,6592	3,5012
LOEC µM	13,2199	0,5892	0,4199	0,0912	32,3005	39,9457	34,3336	2,9197
SD LOEC µM	11,6385	0,4318	0,1951	0,0334	27,9203	0,0000	0,0000	1,8077

## 6.2 Geleidbaarheid van de effluenten

Effluent nummer	geleidbaarheid mS/cm
9910010383/47	0.8
9910014506/47	22.2
9910014708/47	61.9
9910015019/47	21.3
9910016205/47	13.92
9910016337/47	28.5
9910017154/47	0.7
9910018127/47	15.53
9910018290/47	47.7
00100826/47	0.95
00104819/47	6.1
00105141/47	1.8
00105283/47	6
00107354/47	0.42
00108085/47	2.1
00113101/47	61
00114174/47	47.5
00117416/47	73.9