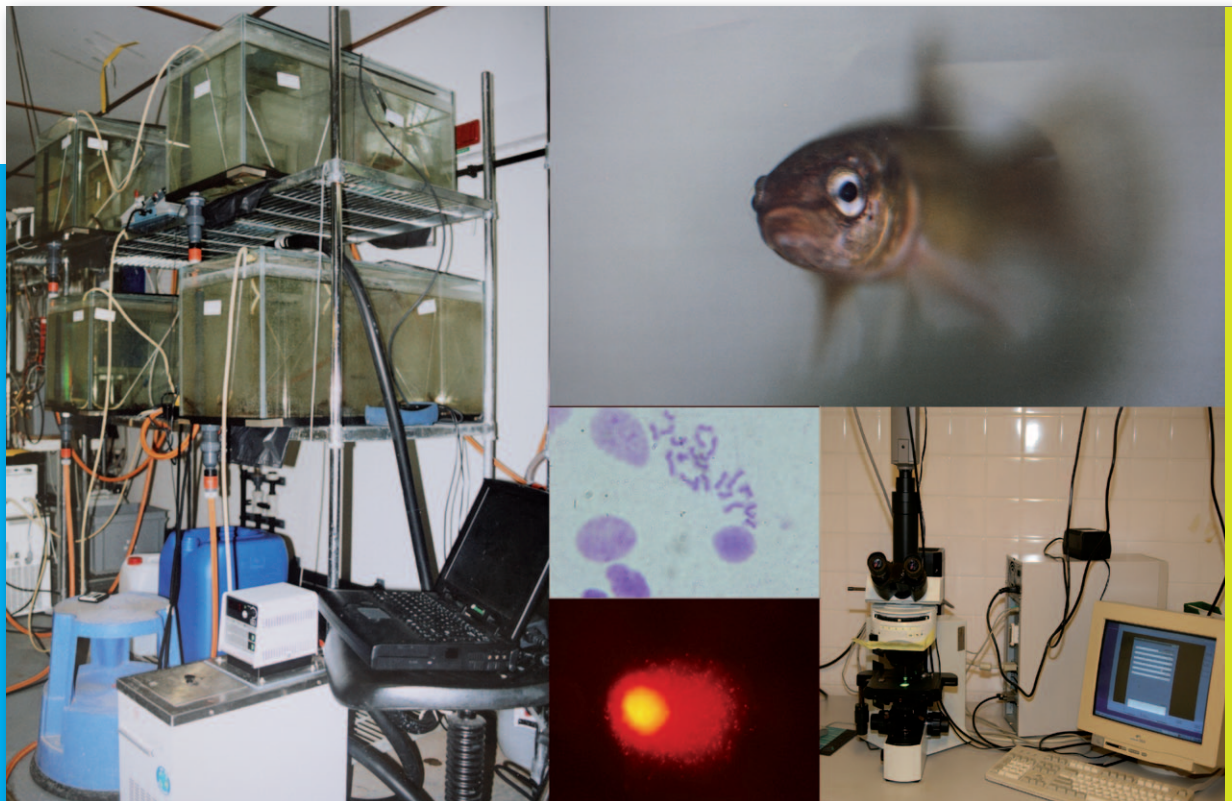


Onderzoek naar genotoxische effecten in de Amerikaanse hondsvij (Umbra pygmaea) na langdurige blootstelling aan Rijnwater zoals beoordeeld door het gebruik van de *in vivo* SCE en Comet assays.



E.J.M. Penders <sup>1,2</sup>

A. Spenkelink <sup>3</sup>

W. Hoogenboezem <sup>1,2</sup>

G.M. Alink <sup>3</sup>

<sup>1</sup> RIWA, Vereniging van Rivierwaterbedrijven Rijn, Nieuwegein, Nederland

<sup>2</sup> Het Waterlaboratorium, Haarlem, Nederland

<sup>3</sup> Wageningen Universiteit, Divisie Toxicologie, Nederland

## **Dankwoord**

De auteurs bedanken Staatsbosbeheer, in het bijzonder de heren P. Zeegers en C. Luijten van het Nationaal Park “De Groote Peel” (Ospel, Nederland), voor de toestemming en hulp bij het vangen de Amerikaanse hondsvissen die voor deze studie nodig waren. Wij danken dr. P.G. Stoks (RIWA) voor de waardevolle opmerkingen op een eerdere versie van dit artikel. Dit onderzoek is medegefinancierd door Rijkswaterstaat.

**RIWA**

Vereniging van  
Rivierwaterbedrijven

Onderzoek naar genotoxische  
effecten in de Amerikaanse hondsvij  
(*Umbra pygmaea*) na langdurige  
blootstelling aan Rijnwater zoals  
beoordeeld door het gebruik van de  
*in vivo* SCE en Comet assays.



E.J.M. Penders <sup>1,2</sup>

A. Spenkelink <sup>3</sup>

W. Hoogenboezem <sup>1,2</sup>

G.M. Alink <sup>3</sup>

<sup>1</sup> RIWA, Vereniging van Rivierwaterbedrijven Rijn, Nieuwegein, Nederland

<sup>2</sup> Het Waterlaboratorium, Haarlem, Nederland

<sup>3</sup> Wageningen Universiteit, Divisie Toxicologie, Nederland

# Samenvatting

# 1

*In vitro* mutageniteitstudies (Ames test) via de vereniging van Rivierwaterbedrijven (RIWA) hebben aangetoond dat de genotoxiciteit van de Rijn in de periode 1981 tot 2001 geleidelijk is gedaald. In het *in vivo* onderzoek naar genotoxiciteit in 2005 werd de afname van de genotoxiciteit ook waargenomen in vergelijking met een studie in 1978. Hierbij werden Amerikaanse hondsvissen (*Umbra pygmaea*) blootgesteld aan Rijnwater. De kieuwcellen van de vissen werden gebruikt voor onderzoek naar chromosoomschade met de Sister Chromatide Exchange (SCE) test en de Comet assay. In het genotoxiciteitsonderzoek van 2005 werd een verhoging in genotoxiciteit waargenomen na 11 dagen blootstelling vergeleken met de drie dagen blootstelling. Dit wierp de vraag op bij RIWA Rijn of een nog langere blootstelling aan Rijnwater een verdere toename van genotoxiciteit te zien zou geven. Deze vraag is de aanleiding voor de huidige studie, waarbij de onderzoeksvragen zijn:

- Leidt langere blootstelling tot een verdere verhoging van de *in vivo* genotoxiciteit?
- Bevestigt een herhalingsonderzoek dat *in vivo* genotoxiciteit lager is dan in 1978?
- Is de Comet assay een geschikt alternatief voor de SCE-test?

Verlenging van de blootstellingsduur van hondsvissen aan Rijnwater van 11 dagen tot 42 dagen leidde niet tot een aanzienlijke toename van de SCE en de DNA-schade (Comet assay) in kieuwcellen van de Amerikaanse hondsviis. De nieuwe gegevens bevestigen dat de *in vivo* genotoxiciteit van Rijnwater op dit moment lager is dan in 1978 en ook vergelijkbaar is met de waarden gemeten in 2005. De Comet assay is een waardevolle aanvulling, maar voorziet op dit moment niet in een volledige vervanging van de SCE test als *in vivo* genotoxiciteitstest.

De productie van drinkwater uit rivierwater vereist een zekere minimale kwaliteit van rivierwater. De vereniging van Rivierwaterbedrijven (RIWA) voert een monitoringprogramma uit om die waterkwaliteit te beoordelen en in de tijd te volgen. Naast frequente analytisch chemische analyses, die directe informatie leveren over het niveau van organische of andere chemische verontreinigingen in het oppervlaktewater, werd ook regelmatig de genotoxiciteit gemeten in de Rijn. In 1978 werd aangetoond dat vissen blootgesteld aan Rijnwater chromosoomafwijkingen ontwikkelden in hun kieuwcellen [Alink *et al.*, 1980]. In de periode 1981-2001 werd de *in vitro* Ames-test gebruikt om de genotoxiciteit van Rijnwater te bepalen in geconcentreerde watermonsters. In deze periode bleek een daling van genotoxiciteit in Rijnwater waarneembaar. Aanvankelijk lag het maximum op 600 – 700 revertanten per liter. Echter deze maxima daalden tot een niveau van 200 – 300 revertanten per liter in 2001 [Hoogenboezem en Penders, 2003]. Om de genotoxiciteit in cellen van gewervelde dieren te bepalen, werd in 2005 een studie uitgevoerd, waarbij de *in vivo* genotoxiciteit van Rijnwater werd gemeten in kieuwcellen van Amerikaanse hondsvissen (*Umbra pygmaea*) met behulp van de Sister Chromatide Exchange (SCE) test en de Comet assay [Alink *et al.*, 2007]. De Comet assay werd in die studie voor de eerste keer toegepast. De belangrijkste conclusie van deze studie was dat ongeconcentreerd Rijnwater nog altijd genotoxische verbindingen bevat die in staat zijn om SCEs en DNA-schade in kieuwcellen van Amerikaanse hondsvissen te veroorzaken. Opvallend in de SCE resultaten was dat er na drie dagen blootstelling een lichte maar niet significante verhoging waarneembaar was en dat er een significante toename waarneembaar was na elf dagen blootstelling. De resultaten met de Comet assay vertoonden een vergelijkbaar beeld, d.w.z. een lichte verhoging na drie dagen en een sterkere verhoging na elf dagen. Dit suggereert een dosis- en/of tijd-afhankelijke stijging van de *in vivo* genotoxiciteit na langdurige blootstelling. Een dergelijke toename van *in vivo* genotoxiciteit na langdurige blootstelling aan water met dergelijke genotoxische verbindingen kan een risico vormen voor de in het water levende organismen. De vraag is of een dergelijk risico ook speelt voor consumenten die gedurende lange tijd drinkwater bereid uit dergelijk oppervlaktewater gebruiken. Hierbij moet wel benadrukt worden dat een waarneming van genotoxische verbindingen in de grondstof voor drinkwaterbereiding niet automatisch betekent dat dergelijke verbindingen bij het zuiveringsproces niet worden verwijderd. Nader onderzoek is nodig om na te gaan of de gebruikte zuivering voldoende is of dat extra zuiveringen stappen nodig zijn om dit risico te verminderen. De gevolgen van langdurige blootstelling aan organische stoffen in lage concentraties aanwezig in Rijnwater kunnen worden bestudeerd met behulp van een vis-model met een langere blootstellingstermijn. Dit wierp de vraag op of een nog langere expositie aan Rijnwater een verdere toename van genotoxiciteit te zien zou geven. Deze vraag is de aanleiding voor de huidige studie, waarbij de onderzoeksvragen zijn:

- Leidt langere blootstelling (tot 42 dagen) tot een verdere verhoging van de *in vivo* genotoxiciteit?
- Bevestigt een herhalingsonderzoek dat de *in vivo* genotoxiciteit lager is dan in 1978?
- Is de Comet assay een geschikt alternatief voor de SCE-test?

# Materialen en methoden

## Chemicaliën

Alle reagentia waren van pro-analyse kwaliteit. Ethylmethaansulfonaat (EMS) werd verkregen van Fluka (Buchs, Zwitserland). Natrium-N-lauroylsarcosine, collagenase, bovine serum albumine (BSA), fosfaat gebufferde zoutoplossing (PBS), agarose (normaal smeltpunt; NMP), agarose (een laag smeltpunt; LMP), HEPES, ethidiumbromide, broomdeoxyuridine (BrdU), colchicine, Hoechst 33528 en Giemsa werden verkregen van Sigma-Aldrich (Zwijndrecht, Nederland). Kaliumchloride (KCl), natriumchloride (NaCl), azijnzuur, EDTA, natriumhydroxide (NaOH), fosfaat- en citraatzouten voor buffers, Triton-X-100, methanol, en DMSO werden verkregen van VWR International BV (Amsterdam, Nederland). Tris werd verkregen van Invitrogen (Breda, Nederland).

## Experimentele opstelling en blootstelling aan Rijnwater

Na toestemming van de Dier Experimenten Commissie van de Universiteit Wageningen werden negentig Amerikaanse hondsvissen (*Umbra pygmaea*) in samenwerking met Staatsbosbeheer verzameld uit kleine plassen in het Nationaal Park “De Groote Peel” (zie Figuur 1), een natuurgebied in de buurt van Ospel (Noord Limburg). De vissen werden overgebracht naar Pompstation Cornelis Biemond (Nieuwegein). Om stress te voorkomen, werden de vissen geleidelijk aangepast aan de omstandigheden van Rijnwater en controle water. Gedurende een periode van 14 dagen werd het “Groote Peel water” langzaam verdund met Rijnwater of grondwater in het geval van de controle. Vissen werden dagelijks gevoed met ingevroren rode muggenlarven (chironomiden) tot het einde van de blootstelling.



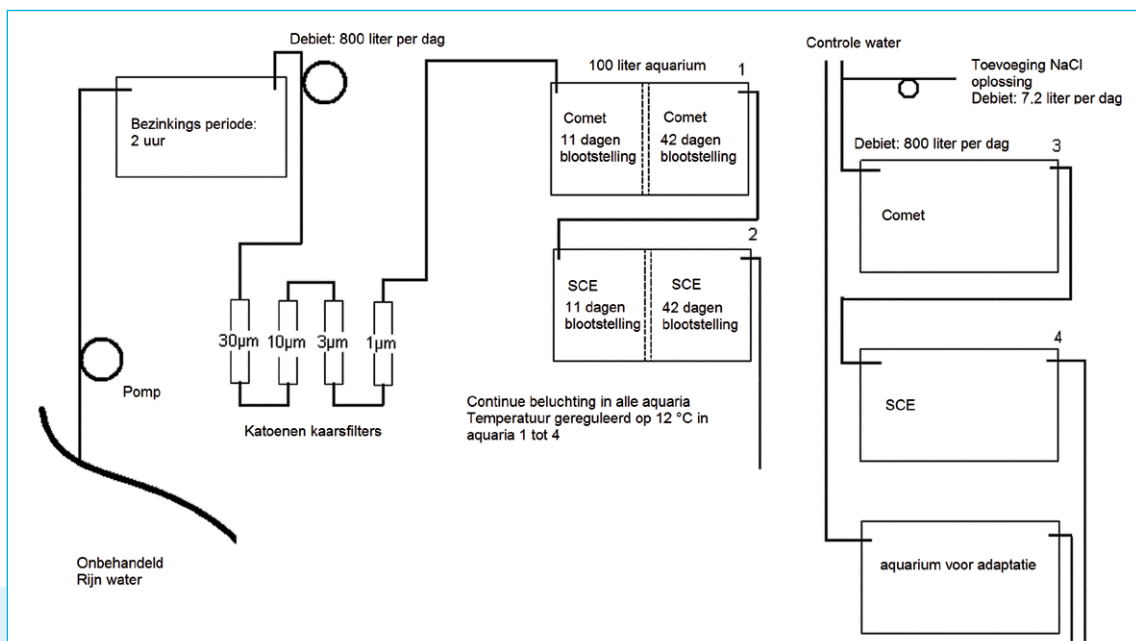
Figuur 1: Visvangst van Amerikaanse hondsvissen (*Umbra pygmaea*) in Nationaal Park “De Groote Peel” in samenwerking met Staatsbosbeheer te Ospel.

Vissen werden blootgesteld aan Rijnwater of aan controlewater op dezelfde manier en op dezelfde locatie als in het voorgaande experiment in 2005 [Alink *et al.*, 2007]. Het controlewater was grondwater van drinkwaterkwaliteit. Het grondwater is afkomstig uit een diep watervoerend pakket van meer dan 100 jaar oud en daarom beschouwd als vrij van verontreinigingen. Voor de distributie aan de afnemers, onderging dit drinkwater alleen een beluchtingsstap en een snelle zandfiltratie. Dit water is niet behandeld met desinfectiemiddelen. Dit water is ideaal als controle water omdat dit pakket is beschermd tegen infiltratie van rivierwater. Evenals in eerdere studies werd natriumchloride (NaCl) toegevoegd aan het controle water om de geleidbaarheid te verhogen tot hetzelfde niveau als Rijnwater (ongeveer 700 mS/cm). De pH van Rijnwater en controlewater was voor beide rond 8. Er waren geen andere relaties tussen het controlewater en het Rijnwater, waardoor de grondwatercontrole kan worden beschouwd als een laboratorium blanco.

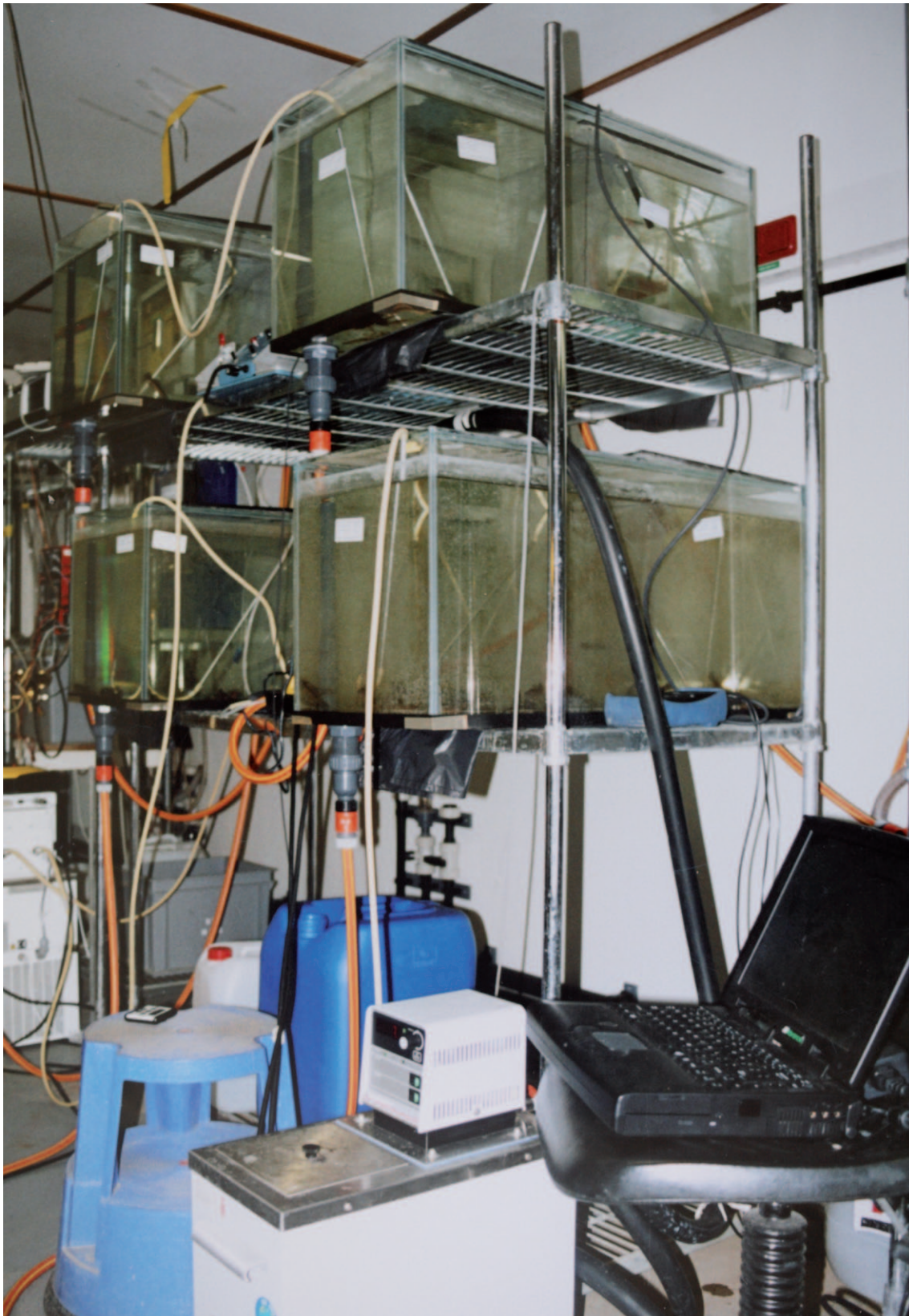
De blootstelling begon op 4 december 2007. Acht vissen voor de Comet assay en twaalf vissen voor de SCE-test werden blootgesteld aan Rijnwater gedurende 42 dagen. Op 4 januari 2008 werden vier vissen voor de Comet assay en zes voor de SCE-test blootgesteld aan Rijnwater voor 11 dagen. Twee groepen van vissen, 8 voor de Comet en 12 voor de SCE-test, werden gehouden in controle water gedurende 42 dagen.

De vissen werden gehouden in 100 liter glazen continu doorstroomde aquaria (Figuur 2 en 3), met een debiet van 800 liter per dag met continue belichting. Slib werd verwijderd uit Rijnwater, met behulp van een sedimentatie tank en filtratie-eenheid met vier in serie geplaatste katoenen kaarsfilters (met een poriegrootte van respectievelijk 30, 10, 3 en 1 micrometer). Er wordt aangenomen dat alleen opgeloste stoffen en stoffen geadsorbeerd aan deeltjes kleiner dan 1 micrometer deze filters kunnen passeren. De temperatuur van het toegevoegde water werd continue op 12°C gehouden door gebruik van elektrische verwarming.

Voor de positieve controle werden zes vissen voor de SCE-test en vier vissen voor de Comet assay, in aparte 5-liter aquaria, gedurende drie dagen aan ethylmethaansulfonaat (25 mg /l) blootgesteld.



Figuur 2: Schematische weergave experimentele opzet van de blootstelling van Amerikaanse hondsvissen (*Umbra pygmaea*) aan Rijn- en controlewater.

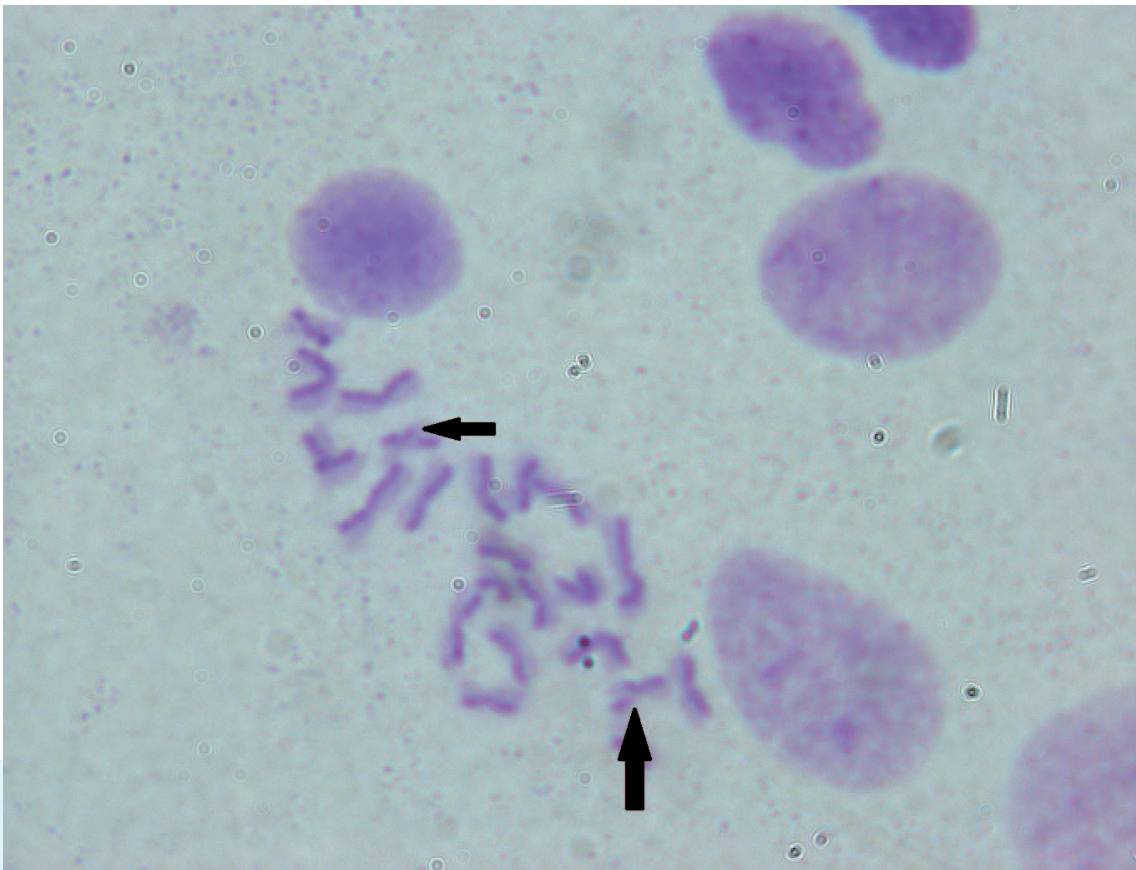


*Figuur 3: Opstelling ter plaatse ten behoeve van de blootstelling van Amerikaanse hondsvissen (Umbra pygmaea) aan Rijn- en controlewater.*



### Sister chromatide exchange (SCE)-test

De Sister Chromatide Exchange *in vivo* techniek, zoals beschreven door Kligerman en Bloom [1976], is gebruikt met kleine aanpassingen. Voor de experimenten werden negen vissen gebruikt voor de controle groep en werden er vijf vissen gebruikt voor de groep met elf dagen blootstelling aan Rijnwater. Voor de 42 dagen blootstelling aan Rijnwater werden acht vissen gebruikt. Alle vissen voor de SCE-test werden intra-peritoneaal (i.p.) geïnjecteerd met 0,5 mg BrdU/g vis en werden 10 dagen blootgesteld (2 cel cycli) aan dit DNA-base analoog. Aan het einde van de blootstellingsperiode werden de vissen i.p. geïnjecteerd met 0,25 mg colchicine/g vis. 10-12 uur later werden de vissen gedecapiteerd, de kieuwen verwijderd en gedurende 30 minuten in een 0,4% hypotone oplossing van KCl geplaatst. Het kieuwweefsel werd vervolgens gefixeerd in een methanol-azijnzuur oplossing (3:1). Celpreparaten werden gemaakt volgens de Kligerman en Bloom [1977] techniek. De cellen werden minimaal 24 uur gedroogd en daarna gekleurd volgens een aangepaste fluorescentie-plus-Giemsamethode [Perry en Wolff, 1974]. De preparaten werden eerst behandeld met Hoechst 33528 (50 µg/ml) in Sorensen's buffer (pH 7,0) gedurende 10 minuten in het donker, gespoeld met gedestilleerd water en vervolgens blootgesteld aan UV-straling (HPW 125 WT, Philips, België) gedurende 4 uur in een fosfaat-citraat buffer (pH 7,0). Vervolgens werden de preparaten verwarmd in natriumcitraatbuffer bij 60°C gedurende 40 minuten en 10 minuten gekleurd in 5% Giemsa in Sorensen's buffer (pH 6,8). De preparaten werden minstens 48 uur gedroogd, waarna de preparaten gereed zijn voor microscopisch onderzoek en de SCE's (Figuur 4) gescoord kunnen worden. De preparaten werden gecodeerd zodat de waarnemer niet weet om welk preparaat het gaat (dubbelblind methode).

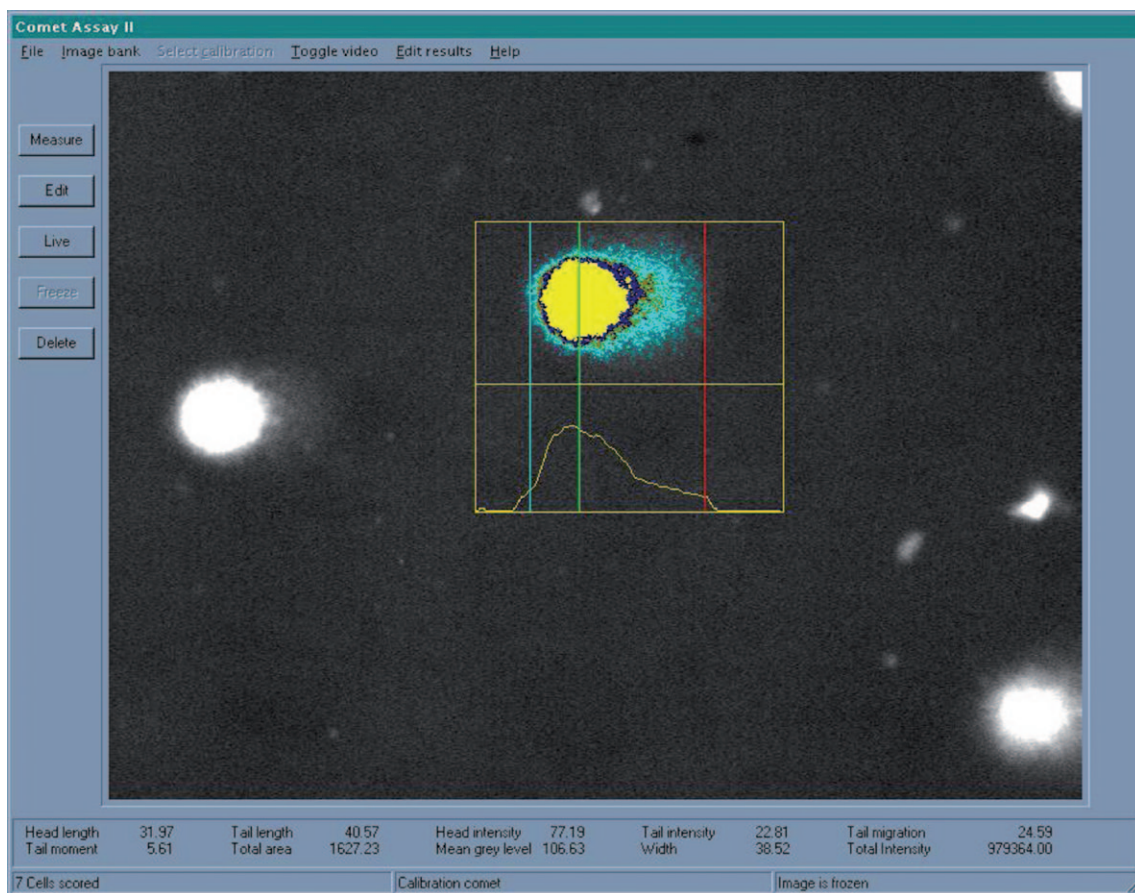


Figuur 4: De metafase van een kieuwcel van de Amerikaanse hondsvijl met twee gescoorde sister chromatide exchanges (zie pijlen).

## Comet assay

De hier toegepaste alkalische Comet assay is aangepast voor toepassing voor Amerikaanse hondsvissen (*Umbra pygmea*) ten opzichte van de oorspronkelijke procedure die werd beschreven voor de zebra vis (*Danio rerio*) [Schnurstein en Braunbeck, 2001] en die voor de driehoeksmosselen (*Dreissena polymorpha*) [Osman *et al.*, 2004]. Na de blootstellingsperiode werden vier vissen gedecapiteerd. Voor de Comet assay werd het aantal vissen gebruikt volgens de aanbevelingen beschreven door Hartmann *et al.* [2003]. De kieuwen van de vis, en de daaropvolgende celsuspensies en elektroforese preparaten werden zoveel mogelijk in donker of gedempt licht gehouden om fotolyse te voorkomen. Direct na verwijdering van de kieuwen werden deze overgebracht in koude PBS buffer met 5 mM HEPES en 0,65 mM EDTA. De celsuspensie werd verkregen door behandeling van het kieuwweefsel met een collagenase-oplossing gedurende 15 minuten. Na filtratie (150 µm poriëngrootte) en centrifugatie (2000 rpm, 5°C, 5 minuten), werd de pellet geresuspendeerd in koude PBS buffer met 5 mM HEPES, 0,65 mM EDTA en 0,1% BSA. De celsuspensie werd gemengd met 1% LMP agarose (37°C) en overgebracht naar een objectglas voorzien van een 1% NMP agarose laag. Vervolgens werd een toplaag van LMP agarose (1:1 verdund met PBS en 0,1% BSA) over de eerste laag aangebracht. Per vis werden vier preparaten vervaardigd en onderzocht.

De preparaten werden gedurende minstens 1 uur in een koude lysis buffer geplaatst (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris, 1% natrium-N-lauroylsarcosine, 1% Triton-X-100 en 10% DMSO, pH 10).



Figuur 5: Beoordeling van een Comet (DNA van kieuwcel Amerikaanse hondsvij na electroforese) met software Comet II. Het gele vlak is de kern van de kieuwcel. De komeetstaart met DNA schade wordt blauw aangegeven. De staartlengte is de afstand tussen de groene en rode lijn.

Om enkelstrengs DNA te verkrijgen werden de preparaten op een horizontale elektroforese-eenheid geplaatst en bedekt met elektroforese buffer (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13). Na 30 minuten incubatietijd, werd de elektroforese uitgevoerd gedurende 20 minuten bij 25 V en 400 mA (Hoeffer Supersub, Pharmacia Biotech). Vervolgens werden de preparaten gespoeld met neutralisatie buffer (0,4 M Tris, pH 7,5, 5 minuten) en werden de agarose gels gedehydrateerd door het preparaat gedurende 1 – 2 minuten onder te dompelen in 100 % ethanol. Het DNA werd gedurende 10 minuten gekleurd met een ethidiumbromide oplossing (20 µg/ml). De verkregen preparaten werden gescoord met een Olympus BH-2 fluorescentie microscoop (excitatie golflengte 515-560 nm) en met beeldanalyse software Comet II (Perceptive Instruments, Haverhill, Verenigd Koninkrijk). Deze software (Figuur 5) geeft informatie over de waargenomen “kometen”: de staartlengte, het percentage DNA in de staart en het staartmoment (product van de staartlengte en de fractie van de totale DNA in de staart). Bij zeer lage niveau aan DNA-schade, geeft de staartlengte de meeste informatie [Collins *et al.*, 2008]. Per preparaat werden de staartlengtes van 50 kometen gemeten. De preparaten werden gecodeerd zodat de waarnemer niet weet om welk preparaat het gaat (dubbelblind methode).

### **Chemische analyse**

De chemische analyses van de watermonsters uit Nieuwegein werden uitgevoerd door Het Waterlaboratorium (Haarlem). Met behulp van vaste-fase extractie, HPLC en GCMS, werd een scala aan organische verbindingen en andere vervuilende stoffen gemeten. Specifieke informatie over de uitgevoerde analyse kan worden gevonden in de RIWA jaarverslagen 2007 en 2008, beschikbaar op [www.riwa.org](http://www.riwa.org) onder Publicaties of bij de eerste auteur.

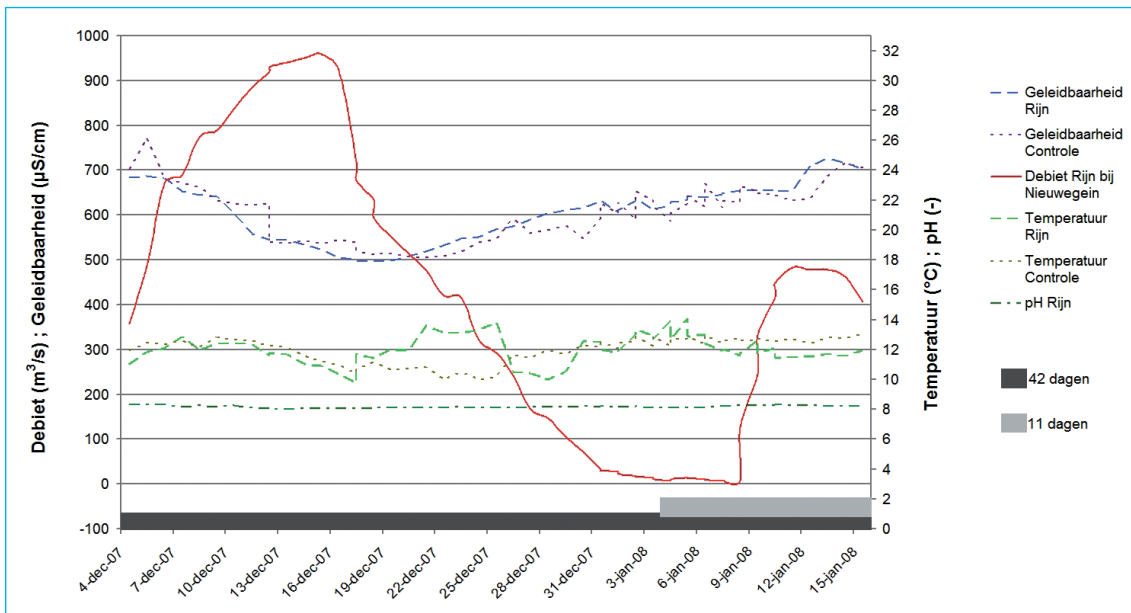
### **Statistiek**

Gemiddelde waarden en standaard fouten van SCE en de staart lengtes werden bepaald. Elke vis werd beschouwd als een test eenheid zoals beschreven door anderen [Hartmann *et al.*, 2003; Tice *et al.*, 2000]. Bij elke test worden de verschillen tussen groepen onderzocht met behulp van de Student's t-toets met significantieniveaus op  $P < 0,05$ .

# Resultaten

## Watercondities

Tijdens de blootstelling van de vissen werd de temperatuur van het water in beide groepen (controle en Rijn-groep) kunstmatig op 12°C gehouden (Figuur 6). Afhankelijk van de verandering in geleidbaarheid van het Rijnwater, werd ook de geleidbaarheid van het water voor de controle groep aangepast. De geleidbaarheid van het Rijnwater nam af met toenemende afvoer van de rivier de Rijn. De pH-waarde bleef constant over de gehele periode. De totale hardheid van het controle water bedroeg 202 mg/l CaCO<sub>3</sub>.



Figuur 6: Debiet en zuurgraad (pH) in het Rijnwater tijdens de blootstellingen. Geleidbaarheid en temperatuur in het Rijnwater en in de controlegroep gedurende beide blootstellingsperioden (horizontale staven).

## Fysisch-chemische kwaliteitsparameters van het Rijnwater

De algemene fysisch-chemische kwaliteitsparameters van het Rijnwater in december 2007 en januari 2008 zijn weergegeven in Tabel 1, samen met jaargemiddelden van 2007 en 2008.

Tabel 1: De algemeen fysisch-chemische kwaliteitsparameters van het Rijnwater in december 2007 en januari 2008 (n = 4) en de jaargemiddelden van beide jaren.

	Eenheid	December 2007	Gemiddelde 2007 (n=13)	Januari 2008	Gemiddelde 2008 (n=13)
Temperatuur	°C	2,1	13,2	8,1	13,2
Zuurstof	mg/l	12,3	9,45	12	9,63
Troebelheid	FTE	36	30,7	40	23
Gesuspendeerde stoffen	mg/l	32	24,7	23,1	28,4
Totale hardheid	mg/l CaCO <sub>3</sub>	197	219	240	221
Totaal Organische Koolstof	mg/l	4,2	3,53	3,3	3,12
Biologisch Zuurstof Verbruik	mg/l	<1	<1	NB	1,52
Chemisch Zuurstof Verbruik	mg/l	15	12,8	NB	9,75

NB=Niet Beschikbaar, *cursief getal* = jaargemiddelde (n = 4)

Aanvullend op de regulier chemische analyses in het kader van het RIWA monitoringprogramma werden voor dit onderzoek een aantal extra analyses uitgevoerd. Een geselecteerde set van de resultaten voor de kwantificering van organische verbindingen voor dit programma is weergegeven in Tabel 2, waarin alleen resultaten boven de detectiegrens ( $\geq 0,01 \mu\text{g/l}$ ) zijn opgenomen. Op basis van deze parameters werden geen belangrijke veranderingen in gehalten waargenomen tussen de periode 11 dagen en 42 dagen. Tabel 2 geeft bovendien aan of de gedetecteerde verbindingen al dan niet bekend staan als mutageen [Anoniem, 2011] en welke verbindingen zijn vermeld als kankerverwekkend, genotoxisch of reprotoxisch [Pflaumbaum, 2010]. Hieruit volgt dat het Rijnwater dat onderzocht werd in deze studie een verscheidenheid van verbindingen bevatte die in verband kunnen worden gebracht met genotoxiciteit, zij het dat het om heel lage concentraties gaat.

Tabel 2: Organische verontreinigingen (gemiddelde concentratie in µg/l) in het Rijnwater (locatie Nieuwegein); vergelijking 11 en 42 dagen blootstelling.

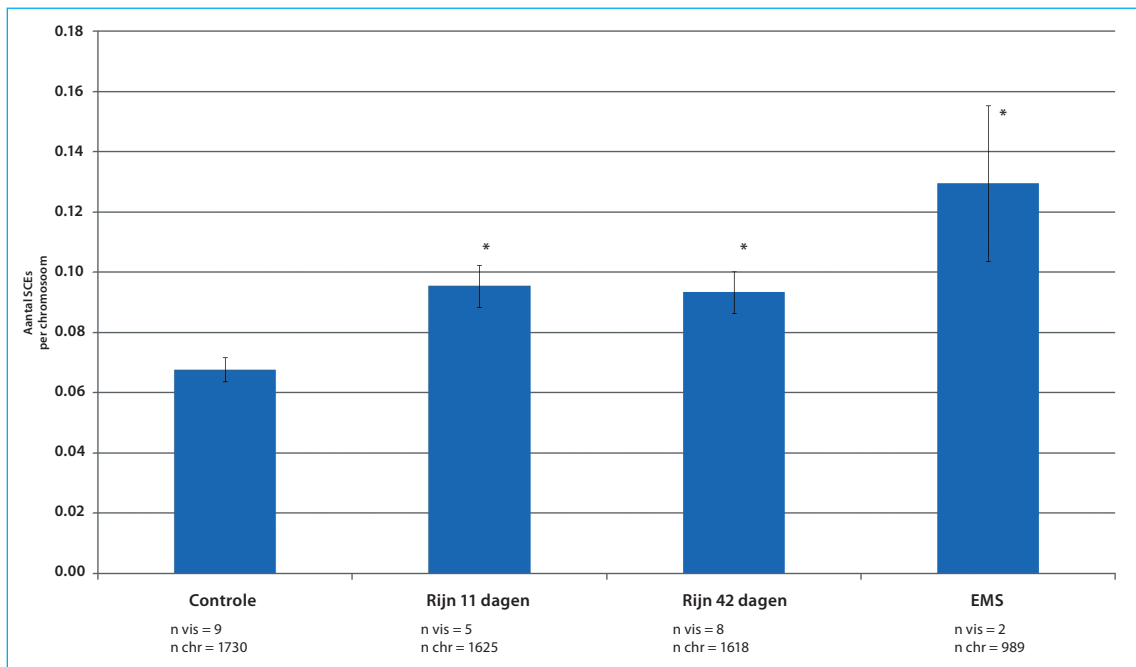
Naam verbinding	CAS-nummer	42 dagen		11 dagen		toename/ afname
		gemiddelde concentratie (µg/l)	aantal metingen	gemiddelde concentratie (µg/l)	aantal metingen	
o-xyleen	95-47-6	0,028	3	0,016	1	-
m- and p-xyleen	108-38-3 en 106-42-3	0,040	3	0,027	1	-
1,3,5-trimethyl benzeen	108-67-8	0,010	3	0,016	1	+
2-methylaniline @, # en 4-methylaniline #	95-53-4 en 106-49-0	0,013	3	0,000	1	-
2-(benzeensulfonyl)aniline	4273-98-7	0,010	3	0,000	1	-
aminomethylfosfonzuur (AMPA)	1066-51-9	0,268	4	0,270	1	+
aniline #	62-53-3	0,059	3	0,075	1	+
adsorbeerbare organische halogenen		12,500	3	11,600	1	-
benzeen @, #	71-43-2	0,038	3	0,000	1	-
bromacil	314-40-9	0,010	2	0,011	1	+
carbamazepine	298-46-4	0,036	14	0,026	4	-
3-(3-chloro-4-methyl- phenyl)-1,1-dimethyl-urea (chlorotoluron) @, #	15545-48-9	0,035	14	0,012	4	-
2-[2-(2,6-dichlorophenyl) amino]phenyl]acetic acid (dichlofenac)	15307-86-5	0,044	2	0,058	1	+
dichloromethane #	75-09-2	0,011	3	0,023	1	+
1-methoxy-2- (2-methoxyethoxy)ethane (diglyme)	70992-86-8	0,128	2	0,173	1	+
2-[2-[2-(bis(carboxymethyl) amino)ethyl- (carboxymethyl)amino] ethyl-(carboxymethyl) amino]azijnzuur (DTPA)	67-43-6	5,197	2	8,050	1	+
dikalium 2-[2-(carboxylatomethyl- (carboxymethyl)amino) ethyl-(carboxymethyl) amino]acetaat (EDTA)	60-00-4	5,233	2	6,475	1	+
ethenylbenzeen	100-42-5	0,009	3	0,014	1	+
ethylbenzeen	100-41-4	0,027	3	0,000	1	-
natrium 2-[(hydroxy-oxido- phosphoryl) methylamino] azijnzuur (glyfosaat)	1071-83-6	0,058	4	0,080	1	+
N <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , N <sub>4</sub> , N <sub>4</sub> , N <sub>6</sub> , N <sub>6</sub> - hexakis (methoxymethyl)- 1,3,5-triazine-2,4,6-triamine (HMMM)	3089-11-0	0,417	12	0,412	3	-
natrium 2- [4-(2-methylpropyl)phenyl] propanoaat (ibuprofen)	15687-27-1	0,022	2	0,031	1	+
1,1-dimethyl-3-(4-propan-2- ylphenyl)urea (isoproturon) #	34123-59-6	0,094	14	0,029	4	-
tolueen @, #	108-88-3	0,141	3	0,000	1	-
2-methoxy-2-methyl- propaan (MTBE)	1634-04-4	0,039	3	0,058	1	+
2-(bis(carboxymethyl) amino) azijnzuur (NTA)	139-13-9	1,579	2	2,053	1	+
diphenylphosphorylbenzeen	791-28-6	0,022	12	0,014	3	-

@ = verbinding bekend als carcinogeen of mutageen [Anoniem, 2011]

# = verbinding bekend als carcinogeen, genotoxisch of reprotoxisch [Pflaumbaum, 2010]

## Sister Chromatide Exchange (SCE)-test

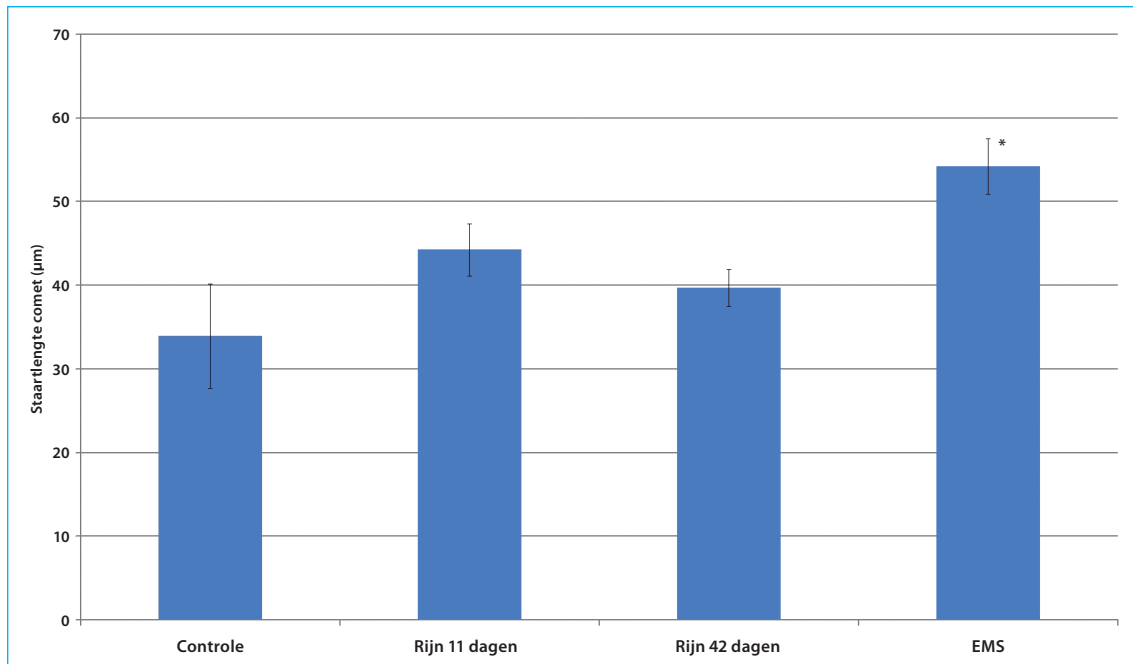
Alle vissen vertoonden effecten in de Sister-Chromatide Exchange test. Na 11 dagen blootstelling aan Rijnwater was er een significante toename van het aantal SCEs per chromosoom in vergelijking met de controlegroep ( $p = 0,007$ ). Ook de vissen die gedurende 42 dagen aan Rijnwater werden blootgesteld vertoonden een significante ( $p = 0,005$ ) toename ten opzichte van de controlegroep. Geen significant verschil in aantallen van SCEs werd waargenomen tussen de 11 dagen en 42 dagen ( $p = 0,92$ ). Hieruit werd geconcludeerd dat er geen toename van de SCE is opgetreden na een verlengde blootstelling aan Rijnwater (Figuur 7).



Figuur 7: Aantallen SCEs per chromosoom in kieuwcellen van de Amerikaanse hondsvij (Umbra pygmaea) na blootstelling aan Rijnwater (Nieuwegein) gedurende 11 en 42 dagen, negatieve controle (grondwater) en aan positieve controle (EMS); De staven geven het gemiddelde en het interval is  $\pm$  SEM; n vis = aantal onderzochte vissen; n chr = aantal onderzochte chromosomen; \* geeft een significant verschil met de controle aan (Student's t-toets:  $p < 0,05$ ).

## Comet assay

De kwaliteit van de kieuwcellen in de voor de Comet assay gebruikte celsuspensie werd vooraf getest met de Trypanblauw-test. De levensvatbaarheid van de kieuwcellsuspensie van alle gebruikte vissen varieerde tussen de 80 en 98%. De gebruikte celsuspensies van alle vissen werden daarom geschikt bevonden voor toepassing in de Comet assay. Zoals weergegeven in Figuur 8, was er een lichte verhoging van de lengte van de komeetstaart bij de vissen die werden blootgesteld aan het Rijnwater gedurende 11 ( $p = 0,21$ ) of 42 dagen ( $p = 0,43$ ) in vergelijking met het controlewater 42 dagen. Deze effecten waren echter niet statistisch significant. Er werd ook geen significant verschil gevonden tussen de vissen die gedurende 11 dagen en 42 dagen aan Rijnwater werden blootgesteld ( $p = 0,29$ ).



Figuur 8: Effect van 11 en 42 dagen blootstelling aan Rijnwater (Nieuwegein) op het DNA in kieuwcellen van de Amerikaanse hondsvij (Umbra pygmaea), gemeten in staartlengten van de Comet assay. De staven geven het gemiddelde en het interval is  $\pm$  SEM; aantal gebruikte vissen is 4; negatieve controle (grondwater) en positieve controle (EMS). \* significant verschil met de negatieve controle (Student's t-toets;  $p < 0.05$ ).



De belangrijkste conclusie van deze studie is dat verlenging van de blootstellingstijd van Amerikaanse hondsvissen aan Rijnwater van 11 dagen tot 42 dagen, niet resulteert in een aanzienlijke stijging van het aantal SCEs per chromosoom, gemeten in kieuwweefsel. Ook werd er, met behulp van de Comet assay, geen verhoogde DNA schade gemeten in kieuwweefsel van Amerikaanse hondsvissen als de blootstellingstijd werd verlengd van 11 tot 42 dagen. Evaluatie van chemische resultaten vertoonde geen significante verandering in de algehele kwaliteit van het water tussen de 42 dagen blootstellingsgroep en de 11 dagen blootstellingsgroep (Tabel 2). Geconcludeerd wordt dat er slechts kleine chemische veranderingen optraden tijdens de periode van blootstelling. Er werd geconcludeerd dat de waterkwaliteit gedurende de hele duur van het experiment ongeveer constant is geweest. De verbindingen die de genotoxische effecten hebben veroorzaakt, konden nog niet uit de huidige dataset worden afgeleid. Verdere studies zijn nodig om de aanwezigheid van genotoxische microverontreinigingen in oppervlaktewater te onderzoeken en in uit oppervlaktewater bereid drinkwater, om te concluderen of wel of niet extra zuiveringsstappen nodig zijn.

De resultaten van deze studie kunnen worden vergeleken met die verkregen in eerdere studies die met geheel vergelijkbare *in vivo* bioassaystesten werden uitgevoerd in 1978 [Alink *et al.*, 1980] en 2005 [Alink *et al.*, 2007]. In de 1978 studie werd nog geen Comet assay uitgevoerd. De resultaten van de SCE-test waren  $0,045 + 0,012$  SCEs/chromosoom voor de (11 dagen) controle,  $0,128 + 0,023$  SCEs/chromosoom na 3 dagen blootstelling en  $0,155 + 0,021$  SCEs/chromosoom bij 11 dagen blootstelling van de vissen aan Rijnwater. Vergelijking van deze waarden met de gegevens van de huidige studie blijkt dat de 2,8- en 3,4-voudige toename van het aantal SCEs/chromosoom voor de 3 en 11 blootstellingsdagen vis in periode 1978 in vergelijking met de controlegroep hoger was dan de 1,4-voudige toename van de nu waargenomen watermonsters in 2008 na 42 dagen blootstelling en de 1,6-voudige toename waargenomen in watermonsters na 11 dagen blootstelling in 2005 [Alink *et al.*, 2007]. Geconcludeerd wordt dat de nieuwe gegevens de conclusie bevestigen die op basis van de studie in 2005 werd getrokken: de *in vivo* genotoxiciteit van Rijnwater is op dit moment lager dan in 1978. De Comet assay werd toegepast in dit onderzoek om de resultaten te vergelijken met de SCE-test. De Comet assay is een snelle, gevoelige en relatief goedkope methode voor het meten van DNA-breuken [Lee en Steinert, 2003] en is gebruikt in diverse milieu-studies in levende organismen in de rivieren [Ohe *et al.*, 2004; Whitehead *et al.*, 2004; Keiter *et al.*, 2006; Liney *et al.*, 2006]. Vergeleken met de SCE-test, heeft de Comet assay vele voordelen, zoals minder tijdrovend (bij zowel de voorbereidingen van preparaten als de microscopische beoordeling van de DNA-schade) en waarbij geen vis een voorbehandeling heeft met BrdU en colchicine. Vanwege de lagere kosten, de geringere arbeidsintensiteit en de mogelijkheid om andere vissoorten te gebruiken, heeft het gebruik van de Comet assay de voorkeur boven de SCE-test. In de huidige studie gaf de Comet assay een vergelijkbaar resultaat ten aanzien van de positieve controle (EMS) en is er een zelfde tendens zichtbaar als bij de SCE test op verhoogde DNA-schade bij blootstelling van de vissen aan Rijnwater. Echter, de toename van de Comet assay gegevens verkregen uit kieuwcellen van vissen die werden blootgesteld aan Rijnwater, was niet statistisch significant, terwijl de SCE scores statistisch significant hoger waren dan die in de controlegroep. Dit suggereert dat de Comet assay minder gevoelig is dan de SCE-test. Dit kan te wijten zijn aan de aard van de aanwezige chemische stoffen en het feit dat beide testen niet dezelfde klasse van verontreinigende stoffen detecteren. Gezien dit alles, wordt geconcludeerd dat de Comet assay een nuttige aanvulling is, maar kan de SCE niet vervangen in deze *in vivo* genotoxiciteit studies. Toekomstig onderzoek en studies met andere type vervuilingen zullen nodig zijn om vast te kunnen stellen of de testresultaten van de Comet assay en de SCE-test vergelijkbaar zijn.

# Literatuurlijst

Alink GM, Frederix-Wolters EHM, Van der Gaag MA, Van de Kerkhoff JFJ, Poels CLM. 1980. Induction of sister chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water. *Mutat. Res.* 78:369-374.

---

Alink GM, Quik JTK, Penders EJM, Spenkelink A, Rotteveel SGP, Maas JL, Hoogenboezem W. 2007. Genotoxic effects in the Eastern mudminnow (*Umbra pygmaea L.*) after exposure to Rhine water, as assessed by the use of the SCE and Comet assays: A comparison between 1975 and 2005. *Mutat. Res.* 631:93-100.

---

Anoniem, 2011. SZW-lijst van kankerverwekkende stoffen en processen. Staatscourant nr 16, 7 januari 2011.

---

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Galvão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Štětina R. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23:143-151.

---

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18:45-51.

---

Hoogenboezem W, Penders EJM. 2003. Evaluatie van Genotoxiciteit gegevens in de Rijn verzameld over de periode 1981-2001. Het Waterlaboratorium.

---

Keiter S, Rastall A, Kosmehl T, Wurm K, Erdinger L, Braunbeck T, Hollert H. 2006. Ecotoxicological Assessment of Sediment, Suspended Matter and Water Samples in the Upper Danube River, A pilot study in search for the causes for the decline of fish catches. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 13:308-319.

---

Kligerman AD, Bloom SE. 1976. Sister chromatid differentiation and exchanges in adult mudminnows (*Umbra limi*) after *in vivo* exposure to 5-bromodeoxyuridine. *Chromosoma* 56:101-109.

---

Kligerman AD, Bloom SE. 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 34:266-269.

---

Lee RF, Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 544:43-64.

---

Liney KE, Hagger JA, Tyler CR, Depledge MH, Galloway TS, Jobling S. 2006. Health Effects in Fish of Long-Term Exposure to Effluents from Water Treatment Works. *Environ. Health Perspectives*, 114:81-89.

---

Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.* 567:109-149.

---

Osman AM, Rotteveel SGP, Den Besten PJ, Van Noort PCM. 2004. *In vivo* exposure of *D. polymorpha* mussels to the quinines menadione and lawsone: menadione is more toxic to mussels than lawsone. *J. Appl. Toxicol.* 24:135-141.

Perry P, Wolff S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251:156-158.

---

Pflaumbaum, W. 2010. Liste der krebserzeugenden, erbgutverändernden oder fortpflanzungsgefährdenden Stoffe (List of carcinogenic, genotoxic or reprotoxic compounds). Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gezeitlichen Unfallversicherung (IFA), Sankt Augustin.

---

Schnurstein A, Braunbeck T. 2001. Tail moment versus tail length – application of an *in vitro* version of the Comet Assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from Zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49:187-196.

---

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagenesis* 35:206-221.

---

Whitehead A, Kuivila KM, Orlando JL, Kotelevtsev S, Anderson SL. 2004. Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. *Environ. Tox. And Chem.* 23:2868-2877.



<i>E.J.M. Penders</i>	Bezoekadres:	Postadres
<i>W. Hoogenboezem</i>	J.W. Lucasweg 2	Postbus 734
Het Waterlaboratorium	2031 BE Haarlem	2003 RS Haarlem



<i>A. Spenkelink</i>	Bezoekadres	Postadres
<i>G.M. Alink</i>	De Dreijen - Tuinlaan 5	Postbus 8000, Bode 92
Wageningen Universiteit	Gebouw 320	6700 EA Wageningen
Leerstoelgroep Toxicologie	6703 HE Wageningen	
	Nederland	

## Colofon

<b>Uitgever</b>	RIWA-Rijn, Vereniging van Rivierwaterbedrijven
<b>Vormgeving</b>	Meyson Communicatie, Amsterdam
<b>Druk</b>	KDR Marcom, Zaandam
<b>ISBN/EAN</b>	978-90-6683-146-9



**Vereniging van  
Rivierwaterbedrijven**

RIWA-Rijn  
Groenendael 6  
3439 LV Nieuwegein  
T +31306009030  
F +31306009039  
E [riwa@riwa.org](mailto:riwa@riwa.org)  
W [www.riwa.org](http://www.riwa.org)