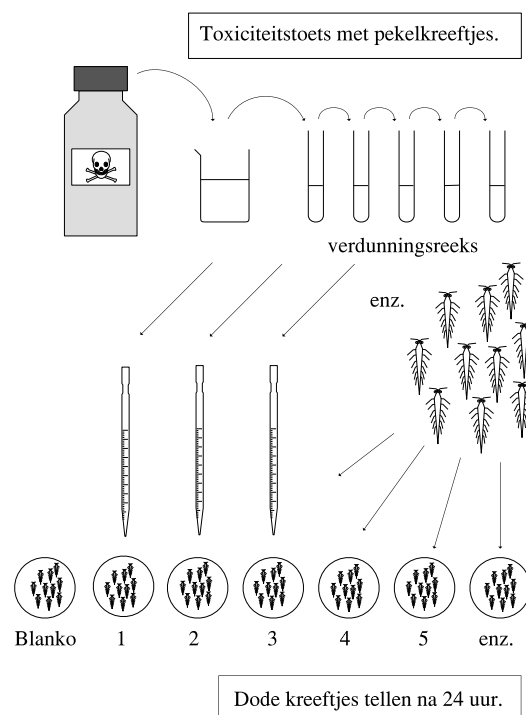


# Practicum Toxicologie 1

code: Tox1



Velp,  
Arthur Rep, augustus 2002

419801

# **Practicum Toxicologie 1**

code: Tox1

## Inhoud

<b>1 Het practicum toxicologie</b>	<b>3</b>
Doel	3
Beoordeling	3
Programma	4
<b>2 De acute toxiciteit van wasverzachters bij <i>Artemia salina</i></b>	<b>5</b>
2.1 Inleiding	5
2.2 Principe van de bepaling	5
2.3 Materialen	6
2.4 Planning en uitvoering	7
2.5 Verslaggeving	8
2.6 Literatuur	9
<b>3 Spot-test: kwalitatieve mutageniteitstest met <i>Salmonella typhimurium</i>-bacteriën</b>	<b>10</b>
3.1 Inleiding	10
3.2 Principe van de bepaling	10
3.3 Materialen	10
3.4 Werkwijze	12
3.5 Opdrachten	13
3.6 Verslaggeving	13
3.7 Literatuur	13
<b>4 Bepaling van paracetamol en -metabolieten in urine met behulp van HPLC</b>	<b>15</b>
4.1 Onderwerp	15
4.2 Toepassingsgebied	15
4.3 Beginsel	15
4.4 Toestellen en hulpmiddelen	16
4.5 Werkwijze	16
4.6 Berekening	17
4.7 Verslag	17
4.8 Literatuur	
<b>5 Bepaling van de eliminatiesnelheid van bietenrood</b>	<b>18</b>
5.1 Onderwerp	18
5.2 Toepassingsgebied	18
5.3 Beginsel	18
5.4 Toestellen en hulpmiddelen	19
5.5 Werkwijze	19
5.6 Berekening	20
5.7 Verslag	20
5.8 Literatuur	20
<b>6 Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van <i>Vibrio fischeri</i></b>	<b>21</b>
6.1 Onderwerp en toepassingsgebied	21
6.2 Termen en definities	21
6.3 Beginsel	22
6.4 Toestellen en hulpmiddelen	22
6.5 Werkwijze	23
6.6 Toetsresultaten	25
6.7 Voorwaarden voor geldigheid	26
6.8 Verslag	26
6.9 Literatuur	26



## 1 Het practicum toxicologie

Deze bundel bevat een aantal relatief eenvoudige, kortdurende toxicologische experimenten waarbij verschillende aspecten van de toxicologiepraktijk worden geïllustreerd.

Hier dienen dan ook GLP-richtlijnen te worden gevolgd zoals die staan vermeld in het OU-diktaat Algemene toxicologie.

Alle experimenten worden uitgevoerd in tweetallen. Alleen het in stand houden van een celkweek wordt individueel uitgevoerd, omdat deze vaardigheid voor iedere laboratoriummedewerker van belang is.

### Doelen

Na dit practicum wordt je in staat geacht:

- Een standaard-toxiciteitstest uit te kunnen voeren en te evalueren met verschillende methodes (grafisch, volgens het logistische model, met speciale computerprogramma's)
- Een risk assessment uit te kunnen voeren voor het werken met carcinogene/ mutagene stoffen.
- Een eenvoudige mutageniteitstest uit te voeren.
- Enkele bepalingen in urine en speeksel uit te voeren teneinde iets te weten te komen over de toxicokinetiek van enkele stoffen.
- Een eenvoudige LumisTox-assay uit te kunnen voeren.
- Een celkweek van hepatoma-cellen in stand te houden.
- Een labjournaal bij te houden volgens GLP-richtlijnen.
- Op efficiënte en theoretisch onderbouwde wijze te rapporteren en te evalueren.

### Afspraken en Beoordeling

- Het practicum wordt uitgevoerd in tweetallen studenten. Beoordeling geschiedt per tweetal.
- Elk tweetal houdt een labjournaal bij.
- Voorbereiding van de practica dient te geschieden buiten practicumtijd.
- De voorbereidende opdrachten in de handleiding dienen aan de docenten te worden overlegd. Als ze naar behoren zijn uitgevoerd worden ze afgevinkt en kan tot uitvoering van het experiment worden overgegaan.
- De minpunten van de beoordeelde verslagen dienen verbeterd te worden. Hierna wordt een cijfer toegekend aan de verbeterde versie.

labjournaal 1 <sup>e</sup> keer	1×
labjournaal 2 <sup>e</sup> keer	1×
opdrachten singlespeciëstest	3×
opdrachten Spot-test	2×
opdrachten bietenrood-bepaling	1×
opdrachten lumistox	3×
werkkwaliteit celkweek	2×



## Programma

Week	Datum	Onderwerp	
35		Inleiding: doelstelling, beoordeling. Single speciëstest: bepaling van $LC_{50}$ en hellingshoek dosis-effectcurve van verschillende wasverzachtters bij het pekelkreeftje <i>Artemia salina</i> . Range-finding experiment. Tellen.	<u>Celkweek</u>  Iedere student krijgt een steriele kweek van hepatoma-cellen. Deze moeten worden overgezet in vers medium.  Op de instructie-video kun je precies zien wat je moet doen en hoe dat moet.  Op het volgende practicum toon je aan de p-leiding je laatste kweekflesje.  Als dit steriel is en nog hepatoma-cellen bevat, heb je deze vaardigheid onder de knie.
36		Inleiding spot-test, bietenrood en lumistox. Instructie-video kweek hepatoma-cellen. Single speciëstest: Routine-experiment. Tellen. Planning spot-test, bietenrood en lumistox.	
37		Uitvoering experimenten met spot-test, bietenrood en lumistox. Uitwisselen resultaten Single speciëstest.	
38		Uitvoering experimenten met spot-test, bietenrood en lumistox. Inleveren verslag Single speciëstest.	
39		Uitvoering experimenten met spot-test, bietenrood en lumistox. Bespreking verslag Single speciëstest.	
40		Uitvoering experimenten met spot-test, bietenrood en lumistox.	
41		Uitwisselen resultaten experimenten met spot-test, bietenrood en lumistox. Opruimen. Afspraken over inleveren verslagen.	

---



## 2 De acute toxiciteit van wasverzachters bij het pekelkreeftje (*Artemia salina*).

### 2.1 Inleiding

Wasverzachters zijn berucht om hun schadelijke werking in het milieu. Ze bevatten als werkzaam bestanddeel de stof di-talk-di-methyl-ammonium-chloride (DTDMAC) of een daarop gelijkende surfactant. Een batch technische DTDMAC bestaat voor 77% uit DTDMAC, 1,7% mono-talk-trimethyl-ammonium-chloride en 13,3% van het oplosmiddel isopropanol. De biologische afbraak van DTDMAC in rioolwaterzuiveringsinstallaties is niet volledig, waardoor de stof terecht komt in het ontvangende oppervlaktewater. Dit is een grote zorg voor de beheerders van de waterkwaliteit, omdat DTDMAC zeer giftig is voor aquatische organismen. Enkele resultaten van een door het RIVM uitgevoerd toxiciteitsonderzoek:

soort	96 uur LC <sub>50</sub> * mg/l	chronische NOEC** mg
Driedoornige stekelbaars	4,5	0,75
Muggelarve ( <i>Chironomus riparius</i> )	9,2	1,34
Slanke poelslak ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	18	0,32
Alg ( <i>Scenedesmus pannonicus</i> )		0,75
Lichtgevende bacterie ( <i>Photobacterium phosphoreum</i> )		5,55
Nitrificerende bacteriën		3

\* 96 uur LC<sub>50</sub>: de concentratie waarbij na 96 uur 50% van de proefdieren sterft.

\*\* chronische NOEC: de hoogste concentratie die niet significant afwijkt van de blanco. Als effectparameter wordt groei en/of ontwikkeling genomen.

De resultaten werden gebruikt om maximum toelaatbare risiconivo's (MTR) te berekenen, waarvan men aanneemt dat ze de natuurlijke ecosystemen geen schade toebrengen. Afhankelijk van de gebuikte methode en betrouwbaarheid vond het RIVM een MTR van 18 tot 100 µg/l.

### 2.2 Principe van de bepaling

Volgens het Nederlands Normalisatie Instituut dienen toxiciteitstoetsen uitgevoerd te worden in de volgorde:

- range finding experiment: verdunningsstappen faktor 10
  - globale toxiciteitstoets: verdunningsstappen faktor  $\sqrt[2]{10} = 3,16$
  - routine toxiciteitstoets: verdunningsstappen faktor  $\sqrt[4]{10} = 1,78$
  - nauwkeurige toxiciteitstoets: verdunningsstappen faktor  $\sqrt[8]{10} = 1,33$
- Er worden dan telkens 5 à 6 concentraties ingezet.

Bestudeer ter voorbereiding §7.3 uit het OU-dictaat of Toxicology.



Toxiciteitstoets met pekeltreeftjes.

verduunningsreeks

enz.

Blanko 1 2 3 4 5 enz.

Dode kreeftjes tellen na 24 uur.

Om de vraag ‘Hoe giftig zijn wasverzachters?’ te beantwoorden gaan we verschillende hoeveelheden wasverzachter toevoegen aan één dag oude pekeltreeftjes en kijken we bij welke hoeveelheid ze dood gaan. Pekeltreeftjes worden uit gedroogde eitjes in zout water opgekweekt en worden door aquariumliefhebbers als voer voor jonge visjes gebruikt. Ze zijn heel gevoelig voor allerlei verontreinigingen en omdat je ze zo makkelijk kunt opkweken, zijn ze een geliefd proefdier om snel onderzoek te doen naar de giftigheid van stoffen, zoals wasmiddelen of wasverzachters. Zo’n onderzoek - *toxiciteitsonderzoek* - voer je niet uit in pure wasverzachter, maar in steeds grotere verdunningen van de te onderzoeken stof.

Zie het schema hiernaast. Toelichting:  
 In pure wasverzachter gaan natuurlijk alle dieren dood, maar als je de wasverzachter voldoende verdunt blijven ze allemaal leven. Wanneer je wasverzachters A en B met elkaar vergelijkt, dan kan het zijn dat A bij grote verdunningen sterfte veroorzaakt, terwijl B al tot sterfte leidt bij een veel minder grote verdunning.

Vraag: welke is giftiger, A of B?

Ons onderzoek voeren wij uit door verschillende producten met elkaar te *vergelijken*. Een vergelijkend warenonderzoek dus.

### 2.3 Benodigde materialen

- 100 pekeltreeftjes, 24 uur oud (handleiding bij de praktikumassistent)
- 200 ml 3% zeewater (30 g keukenzout - zonder jodium! - per liter water, goed belucht, pH=8)
- SDS (natriumdodecylsulfaat)
- diverse wasverzachters
- 10 petrischaaltjes ø6 cm en deksels met nokken of sputumpotjes
- 8 reageerbuizen
- 1 verdeelpipet 10,0 ml
- 9 verdeelpipetten 5,0 ml
- 1 verdeelpipet 1,0 ml
- 2 pasteurpipetten
- speentje
- maatkolf 100 ml
- bovenweger (nauwkeurigheid ≤ 0,01 g)
- ultrasone homogenisator
- watervaste viltstift
- vel logaritmisch waarschijnlijkheidspapier

## 2.4 Planning en uitvoering

Lees onderstaand voorschrift goed door en maak in je labjournaal een grote tabel waarin je alle gegevens kwijt kunt. Voor een aantal handelingen hoef je niet op elkaar te wachten, dus spreek met elkaar af wie welke taak uitvoert.

Noteer bovendien alles wat je doet, wat je berekent en wat je ziet in je labjournaal. Voer alles heel precies uit en let er vooral op dat je telkens goed mengt!

### 2.4.1 Het maken van de concentratiereeks: range-finding.

Een range finding experiment wordt uitgevoerd om vast te stellen in welke orde van grootte de toxiciteit van een stof (product) ligt. Daartoe wordt de te onderzoeken stof getest met 6 verdunningsstappen van een faktor 10.

**Opdracht 1: Ontwerp een range finding experiment waarin je precies beschrijft met welke materialen en hoeveelheden je de toxiciteit van een wasverzachter gaat bepalen.**

Enkele tips:

- Gebruik voor alle verdunningen 3% zeewater.
- Meng 1 ml wasverzachter per 10 ml zeewater goed tot het produkt geheel is opgelost (eventueel ultrasoon).
- Reken alle concentraties precies uit en vermeld ze in je labjournaal.

### 2.4.2 Het inzetten van de pekelkreeftjes.

- 1 giet een scheut zeewater met pekelkreeftjes in een petrischaaltje (voorraadbakje)
- 2 Codeer met een watervaste viltstift alle buizen en schaaltes op duidelijke wijze (op de zijkant van de *bodem*, niet op het dekseltje... dit om verwisseling uit te sluiten)
- 3 pipetteer 9,0 ml 1 % zeewater in de schaaltes waarin wasverzachter komt en 10,0 ml in het blanco schaalte
- 4 pipetteer 1,0 ml van elke toxicantverdunning bij de schaaltes
- 5 zwenk alle schaaltes een paar keer rond terwijl ze plat op tafel blijven liggen
- 6 tel uit het voorraadbakje met een pasteurpipet zonder speentje één voor één 10 pekelkreeftjes af in elk schaalte (doe dit voorzichtig, zorg dat er zo min mogelijk water meekomt met de kreeftjes om verdunning van de concentraties te voorkomen en gebruik alleen actief zwemmende pekelkreeftjes)
- 7 sluit de schaaltes af met de dekseltjes en laat ze tot de volgende dag bij kamertemperatuur in het donker staan
- 8 reken per schaalte precies uit hoeveel het produkt uiteindelijk is verdund en vermeld de uitkomsten in je tabel.



### 2.4.3 Het beoordelen van de pekelkreeftjes.

Dit geschiedt op twee opeenvolgende dagen, 24 en 48 uur na inzetten:

- 1 tel in elk schaalpje de levende en dode dieren (dood = geen beweging meer)
- 2 noteer de resultaten in de tabel in je labjournaal.

Je kunt de proef ook langer laten staan om het effect op langere termijn te bekijken.

### 2.4.3 Het maken van de concentratiereeks voor een routine-toxiciteitstest.

Voor een routine-toxiciteitstoets worden 7 verdunningsstappen van een faktor  $\sqrt[4]{10} = 1,78$  gebruikt.

Maak op basis van het range finding experiment een concentratie-reeks waarin de hoogste concentratie met 0% sterfte en de laagste concentratie met 100% sterfte voorkomen.

Als referentiestof wordt SDS (natriumdodecylsulfaat) gebruikt: de LC50 hiervan ligt tussen 13,3 en 19,9 mg/l.

**Opdracht 2: Ontwerp een routine toxiciteitstoets waarin je precies beschrijft met welke materialen en hoeveelheden je de toxiciteit van jouw wasverzachter en SDS gaat bepalen.**

Voer dit experiment uit.

## 2.5 Verslaggeving

- 1 Neem de tabel uit je labjournaal over en corrigeer zonedig voor dode pekelkreeftjes in de blanco met behulp van onderstaande formule:

$$p' = \frac{p - c}{100 - c} \times 100 \quad (\text{Abbott's formula})$$

waarin:

$p'$  = het gecorrigeerde % dode dieren

$p$  = het gemeten % dode dieren

$c$  = het % sterfte in de blanco

Alleen die experimenten zijn geldig waarbij het percentage sterfte in de blanco niet groter is dan 10%!

- 2 Verwerk de gegevens op drie verschillende manieren :

a Met behulp van van logaritmisches waarschijnlijkheidspapier:

- zet de concentraties uit op de horizontale as en op de verticale as het gecorrigeerde % dode dieren
- er mag een lineair verband worden verondersteld tussen beide grootheden
- de lijn wordt als volgt geconstrueerd: van belang zijn de punten tussen 16 en 84% sterfte; door deze punten moet een zo horizontaal mogelijke lijn worden getrokken; op deze manier wordt het beste rekening gehouden met de onnauwkeurigheid, behorende bij de uitgezette waarden.

- interpoleer de  $LC_{50}$ .
- b Met behulp van MS Excel. Zet hiertoe de concentratiewaarden om in  $\log(\text{concentratie})$  en de percentages sterfte om in logits (zie ook deel 1 van de cursus Algemene Toxicologie of Toxicology, hoofdstuk 7)
- c Met behulp van de programma's SPEARABB.EXE of LC50.EXE:
  - voer de gegevens in
  - noteer de berekende  $LC_{50}$  met betrouwbaarheidsinterval.

**Opdracht 3: Geef de gevonden  $EC_{50}$ -waarde en de per wasbeurt benodigde hoeveelheid wasverzachter door aan de P-leiding.**

De P-leiding verzamelt de gevonden waarden en plaatst die in een tabel. Deze wordt aan de practicanten uitgedeeld voor het maken van het verslag.

**Opdracht 4: Schrijf een verslag over het experiment.**

In dit verslag dienen de volgende zaken aan de orde te komen:

- 1 Inleiding: principe, doel. In standaard-toxiciteitstesten wordt ter controle de  $LC_{50}$  van een referentiestof (hier: SDS) bepaald. Waarom gebeurt dit?
- 2 Materiaal en methode. Gebruikte stoffen, verdunningsschema's van range-finding en routinetest.
- 3 De eigen resultaten. Zijn de resultaten betrouwbaar, met andere woorden:
  - lopen de grafieken mooi recht?
  - was er een hoge sterfte in de blanco?
  - zijn er onverwachte dingen gebeurd?
  - probeer eventuele afwijkingen ook te verklaren.
  - vergelijk de drie verschillende statistische methoden en verklaar eventuele verschillen.
- 4 Vergelijk en toets de klassikale resultaten van de verschillende wasverzachters.
- 5 Schrijf een steekhoudende discussie.

Lever gelijk met het verslag de labjournaals in.

### 2.6 Literatuur

- Roghair, C.J. , Buijze, A. en Schoon, H.N.P., 1991. Maximum permissible level of the cationic surfactant DTDMAC for aquatic ecosystems. RIVM-rapport 719192 007, Bilthoven.
- Kluge, B., 1989. Standardisierter kurzzeit-toxizitätstest (akuter test) mit Artemien. Blockpraktikum Ökotoxikologie I. Universiteit van Aken.
- NNI, 1980. Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van *Daphnia magna*. NEN 6501, eerste druk.
- Open Universiteit, 1991. Algemene Toxicologie I. OU, Heerlen.
- Niesink et al, 1995. Toxicology, principles and applications. CRC press. 1<sup>e</sup> druk. Boca Raton, Florida.

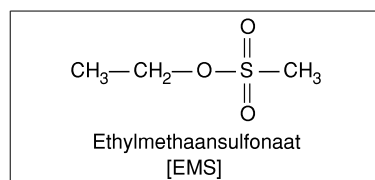
## 3 Spot-test: kwalitatieve mutageniteitstest met *Salmonella typhimurium*

### 3.1 Inleiding

De Spot-test is een kwalitatieve mutageniteitstest met *Salmonella typhimurium*-bacteriën. Een druppel of een kristalletje van de te testen stof wordt op het midden van een met bacteriën geënte selectieplaat gebracht. De plaat wordt 48 uur geïncubeerd bij 37°C. De stof zal in de voedingsbodem diffunderen en indien deze stof mutageen is aanleiding geven tot de vorming van mutanten rondom de plaats waar de stof is opgebracht (halo-effect). Deze test werkt erg snel, maar geeft alleen een kwalitatieve (mutageen of niet mutageen) of semi-kwantitatieve (ruwe schatting, vergelijking met andere stoffen) indicatie van de mutageniteit van de stof zelf en niet van de metabolieten.

We gebruiken voor deze test de bacteriestammen TA100 en TA98. Deze stammen hebben enige mutaties ondergaan, waardoor ze geschikt zijn voor deze test. Ze zijn histidine- en biotine-behoefstig, ze hebben een dunner celmembraan waardoor ze niet kunnen overleven in de darm, het reparatiesysteem is weg en ze zijn ampicilline-resistent.

Met TA100 kunnen basepaarsubstituties worden aangetoond en met TA98 frameshiftmutaties. Als referentiestof wordt ethylmethaansulfonaat (EMS) gebruikt. EMS is een alkylerende stof.



### 3.2 Principe

De *Salmonella typhimurium*-bacteriestammen TA100 en TA98 zijn histidinebehoefstig. Op een agarmedium zonder histidine zullen ze niet groeien. Door op de agarplaat een mutagene stof toe te voegen kunnen revertanten (met een terugmutatie) ontstaan die zullen groeien rondom de plaats waar de stof is opgebracht. Het aantal spontane revertanten bedraagt per plaat ca. 30-50 bij TA98 en 80-100 bij TA100.

### 3.3 Materiaal

- Steriele petrischalen (ø 10 cm)
- Steriele topagarbuisjes
- Schudwaterbad (37°C)
- Waterbad (50°C)
- Stoof (37°C)



- Spectrofotometer
  - Steriele erlenmeyer met aangesmolten cuvet
  - microdispensors 100 µl
  - plastic afvalzakken
  - cocktailprikkers
  - veiligheidsbox voor transport en incubatie van pathogenen
- 
- Basismedium (Vogel-Bonner) (steriel):  
1000 ml H<sub>2</sub>O bevat:
    - 0,4 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
    - 4,4 g citroenzuur·H<sub>2</sub>O
    - 20 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
    - 4,4 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O
    - 15 g agar (voor topagar 7,5 g agar)Autoclaveren gedurende 15 minuten bij 121°C
  - Glucose-biotine oplossing (filtersteriel):
    - 20 g glucose en 2,0 mg biotine in 100 ml demiwater
  - Histidine-oplossing (filtersteriel):
    - 0,78 g histidine in 50 ml demiwater
  - Ampicilline-oplossing:
    - 10 mg/1,25 ml steriel demiwater
- 
- Moederplaten (practicumassistent)  
Per 100 ml basismedium:  
Laat afkoelen tot ca. 55°C en voeg aseptisch toe:
    - 2,5 ml glucose-biotine oplossing
    - 400 µl histidine-oplossing
    - 120 µl ampicilline-oplossingGiet 20 ml warme agar per moederplaat, laat stollen (bewaarsel 4°C)
  - Overnachtcultuurmedium (practicumassistent)  
25g Nutrient Broth in 900 ml demiwater.  
Aanvullen tot 1 liter (autoclaveren).  
Voeg aan de oplossing 700 µl histidine-oplossing toe.
- 
- Topagar.  
Basismedium met 0,75% agar wordt in seriele topagarbuisjes met 3,5 ml topagar verstrekt.
- 
- Mutagentia:  
Ethylmethaansulfonaat (EMS)  
NaNO<sub>2</sub> (Natriumnitriet)  
Hydroxylamine  
4-nitroquinoline-1-oxide  
andere stoffen

### 3.4 Werkwijze

**Opdracht 1: Ga naar de website van Larenstein en bezoek bij de opleiding Laboratoriumtechniek de pagina Veiligheid. Bestudeer per tweetal de ChemSafe-cursus (1 uur).**

**Opdracht 2: Bezoek vervolgens de site over het werken met carcinogene stoffen en stel met de de ChemSafe-cursus bij Designing the Experiment een risk assessment op. Laat deze door de docent controleren alvorens tot het praktische gedeelte over te gaan.**

#### 3.4.1 Het opkweken van de bacteriën (*practicumassistent*)

De bacteriën worden opgekweekt in 50 ml verrijkte Nutriënt Broth oplossing:

- 1 Pipetteer in een steriele erlenmeyer met cuvet 50 ml verrijkte Nutriënt Broth oplossing
- 2 Breng vanaf een moederplaat met bacteriekolonies van de TA-stammen enkele kolonies in de erlenmeyer
- 3 Incubeer de erlenmeyers gedurende één nacht in een schudwaterbad van 37°C
- 4 Meet na ongeveer 16 uur de optische dichtheid van de suspensies met behulp van een spectrofotometer. De optische dichtheid van de bacterie-suspensies moet na ongeveer 16 uur liggen tussen de 0.390 en 0.410 bij 700 nm. Als deze te hoog is moet er verdund worden met nutrient broth, als het te laag is moet verder worden geïncubeerd.

#### 3.4.2 De Spot-test

- Omdat *Salmonella* een potentiële pathogeen is, wordt onder C1-conditions gewerkt, dus in de downflowkast, met latex handschoenen aan.
- Ontsmet het werkblad van de downflow met 70% ethanol. Plaats een afvalbakje met verdund bleekwater in de flowkast waarin de lege topagarbuisjes kunnen worden gedaan.
- Werk uiterst voorzichtig met mutagene stoffen, flowkast op halve kracht, veiligheidsbril op, handschoenen aan.
- Ruim de met mutagentia besmette materialen direct op in de daarvoor bestemde plastic zak die aan de flowkast is bevestigd.

### *Gieten van selectieplaten*

- 1 Warm een erlenmeyer met 120 ml basismedium op in een kokend-waterbad
- 2 Laat afkoelen in een waterbad tot ca. 50°C en voeg aseptisch toe:
  - 3,0 ml glucose-biotine oplossing
  - 5 µl histidine-oplossing
- 3 Giet 20 ml warme agar per selectieplaat en laat stollen (bewaar de platen zonodig in afgesloten plastic zakken bij 4°C).

### *Uitvoering van het experiment*

*Opmerking: de topagar moet zeer snel verwerkt worden, omdat die anders voortijdig stolt!*

- 4 Smelt de topagar-buisjes op in een kokend-waterbad
  - 5 Plaats de buisjes in een waterbad van 50°C.
  - 6 Codeer zes selectieplaten volgens onderstaand schema (zie 8a)
  - 7 Haal een buis met topagar uit het waterbad, droog deze onmiddellijk af en pipetteer in de flowkast 100 µl bacteriesuspensie in de buis. Meng het buisje **snel** en grondig door het tussen de handen heen en weer te rollen. Verdeel de inhoud van het buisje direct homogeen over een selectieplaat door de plaat te zwenken. Deze stappen worden voor alle zes platen uitgevoerd.
- 8a Vloeibare mutagentia:  
Leg 6 filtreerrondjes van 6 mm in een steriele petrischaal en pipetteer daarop met een micropipet de mutagene stof volgens het onderstaande pipetteerschema:

Plaat nr.	stam	mutagens (µl)
1	TA 98	0
2	TA 98	2
3	TA 98	10
4	TA 100	0
5	TA 100	2
6	TA 100	10

Breng het filtreerpapiertje met een steriele pincet over op het midden van de betreffende selectieplaat.

- 8b Vaste mutagentia:  
Breng volgens bovenstaand schema 0, 2, 10 kristalletjes van de mutagene stof met een vochtige cocktailprikker over op het midden van de plaat.
- 9 Leg de platen omgekeerd in een veiligheidsbox, plaats deze in een stoof van 37 °C en laat de platen 48 uur incuberen.
  - 10 Reinig de flowkast en werp de met mutagens besmette materialen in de afvalzak die aan de flowkast is bevestigd. Verzamel de met *Salmonella* besmette materialen in het bakje met bleekwater en was ze daarna af.

## 3.5 Opdrachten

- Bekijk na deze incubatietijd het effect van de mutagentia en maak een foto van de petrischalen met een goed leesbaar bijschrift. **Neem ook hierbij de**

door jezelf opgestelde veiligheidsregels in acht.

- Ruim de met mutagentia besmette materialen direct op in de daarvoor bestemde plastic zak die aan de flowkast is bevestigd.
- De foto's worden door de practicumleiding verzameld en een overzicht wordt afgedrukt.

### 3.6 Verslaggeving

**Opdracht 3: Schrijf een kort verslag over het experiment.**

In dit verslag dienen vermeld te worden:

- 1 De gebruikte stoffen.
- 2 Opgestelde veiligheidsmaatregelen.
- 3 Een duidelijke tabel met de interpretatie van de foto's (eigen waarnemingen en die van de gehele klas).
- 4 Trek conclusies uit de waarnemingen omtrent de mutageniteit van alle gebruikte stoffen en of het gaat om basepaarssubstituties of frameshift-mutaties.

Lever gelijk met het verslag het labjournaal in.

### 3.7 Literatuur

1. Niesink et al, 1995. Toxicology, principles and applications. CRC press. Ie druk. Boca Raton, Florida.
2. D. M. Maron, B. N. Ames, 1983. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. Elsevier Biomedical Press, 1 13: 173-215.



## Bijlage 1 - Het werken met mutagenen.

Met nadruk willen wij nogmaals wijzen op de gevaren waaraan jij en je medestudenten blootstaan.

Daarom willen we dat jullie je tenminste één uur concentreren op deze gevaren. Hiervoor hebben we de volgende websites geselecteerd. Misschien vind je zelf nog wel betere!

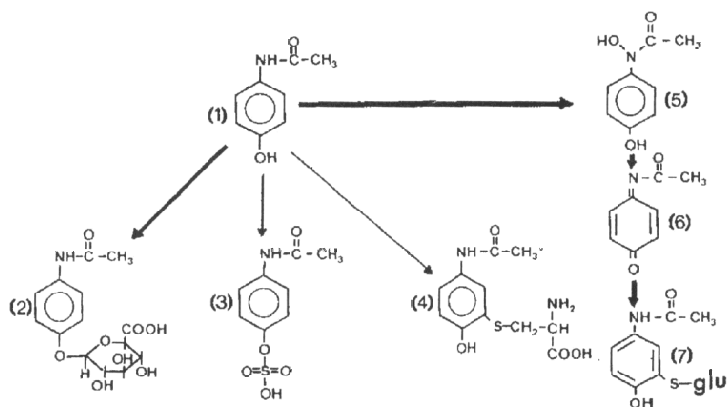
- 1 Bestudeer de Laboratory Safety-pagina's over het werken met gevaarlijke stoffen van Yale university.  
Site: [info.med.yale.edu/caim/umd/chemsafe/intro.html](http://info.med.yale.edu/caim/umd/chemsafe/intro.html)
- 2 Bestudeer de richtlijnen voor het werken met carcinogene stoffen:  
Site: [views.vcu.edu/oehs/chemical/carcinogen.html](http://views.vcu.edu/oehs/chemical/carcinogen.html)
- 3 Je kunt ook zoeken in [www.google.com](http://www.google.com) met de zoektermen:
  - msds en de naam van de stof:
    - ethyl methane sulfonate
    - (nitro)quinoline
    - andere stoffen



## 4 Bepaling van paracetamol en -metabolieten in urine en speeksel met behulp van HPLC

### 4.1 Onderwerp

Paracetamol is een wijdverspreide en gewoonlijk zeer veilige pijnstiller. Bij normaal gebruik wordt paracetamol hoofdzakelijk gemetaboliseerd door conjugatie met glucuronide en sulfaat (fase II-reacties). Bij overdosering leidt de overbelasting van de glucuronide-route tot oxidatie door P450-enzymen, waarbij de zeer reactieve intermediair N-acetyl-benzoquinonimide wordt gevormd, die vervolgens in kleine hoeveelheden wordt gedetoxificeerd door conjugatie met glutathion. Bij grote overdosis of alcoholgebruik is de glutathion-route ontoereikend en reageert het imide met thiolgroepen in structurele eiwitten in de hepatocyten (levercellen) waardoor celdood en leverschade optreedt.



Figuur 1. Biotransformatie van paracetamol met de belangrijkste metabole routes. De dikke lijnen tonen de route bij overdosering (Stewart, 1987).

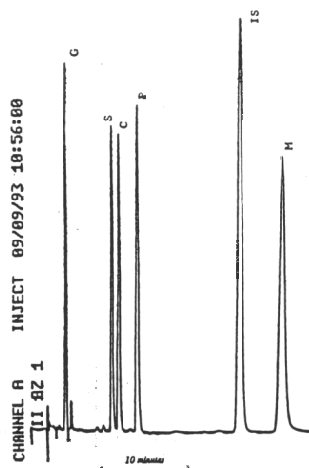
- (1) N-acetyl-4-aminofenol (paracetamol)
- (2) paracetamolglucuronide
- (3) paracetamolsulfaat
- (4) 3-L-cysteinylconjugaat
- (5) N-hydroxy- N-acetyl-4-aminofenol
- (6) N-acetyl-benzoquinonimide
- (7) 3-glutathionylconjugaat (mercapturaat)

### 4.2 Toepassingsgebied

De hier beschreven methode wordt gebruikt om inzicht te krijgen in verschillen in paracetamol-metabolisme tussen zieke en gezonde personen en tussen etnische bevolkingsgroepen.

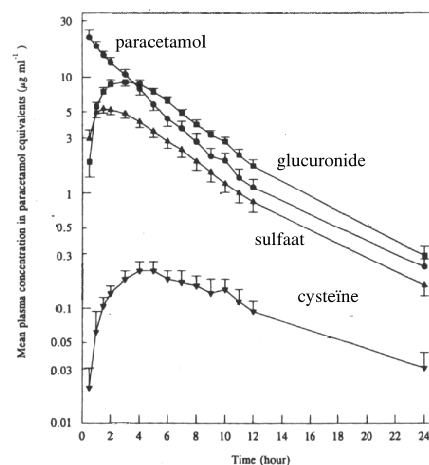
### 4.3 Beginsel

Na het slikken van een kleine dosis paracetamol wordt na 4 uur een urinemonster en een speekselmonster verzameld en geconserveerd. De monsters worden 5× verdund met de interne standaard acetamidofenol (250 µg ml<sup>-1</sup>). Hiervan wordt 20 µl geïnjecteerd in een HPLC-systeem met een C<sub>18</sub>-kolom met een mobiele fase bestaand uit KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, azijnzuur en 2-propanol. De detectiegolflengte is 254 nm.



Figuur 2. De verschillende paracetamolmetabolieten in urine.

- (P) paracetamol
- (G) paracetamolglucuronide
- (S) paracetamolsulfaat
- (C) cysteïnylconjugaat
- (M) mercapturaat
- (IS) interne standaard



Figuur 3. Plasmaconcentraties van paracetamol en -metabolieten op verschillende tijdstippen.

Figuur 2 laat een chromatogram zien van urine gespiked met standaarden van de verschillende metabolieten. Door de gehalten van de verschillende metabolieten tegen de tijd uit te zetten kunnen we een figuur construeren als figuur 3. Dit voeren wij niet uit omdat een groot aantal metingen op de HPLC te veel tijd vergen. Wel gaan we aantonen dat zich in de urine verschillende metabolieten van paracetamol bevinden.

#### 4.4 Toestellen en hulpmiddelen

- afsluitbare potjes van 20 ml met 1 druppel chloroform (om bacteriële afbraak van conjugaten te voorkomen)
- HPLC met C<sub>18</sub>-kolom en UV-detector 254 nm
- mobiele fase KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, azijnzuur en 2-propanol in verhouding 100:0,1:75 v/v
- paracetamol-drank
- paracetamol-stockoplossing 10 mg/ml in urine
- acetamidofenol-stockoplossing 250 µg/ml in urine

#### 4.5 Werkwijze

##### Toediening paracetamol en verzamelen urinemonsters

- 1 Bepaal je lichaamsgewicht.
- 2 Neem op de nuchtere maag 10 mg paracetamol in per kg lichaamsgewicht
- 3 Drink hierna 5 ml sinaasappelsap per kg lichaamsgewicht en wacht nog één uur alvorens te eten; hierna kan naar believen worden gegeten en gedronken.
- 4 Verzamel na vier uur een urinemonster in een afsluitbaar potje van 20 ml met 1 druppel chloroform en bewaar dit in de diepvries. Doe hetzelfde met een monster speeksel.



### **Bepaling van paracetamol en -metabolieten met de HPLC**

Reserveer de HPLC bij Henk Kruk.

- 1 Maak voor het meten de analysemonsters als volgt klaar:  
- voeg aan 500  $\mu\text{l}$  monster 1000  $\mu\text{l}$  water en 1000  $\mu\text{l}$  acetamidofenol-stockoplossing toe en meng grondig
- 2 maak de analysemonsters stofvrij door een 0,45 $\mu$  membraanfilter
- 3 ontgas de analysemonsters in een ultrasoon bad
- 4 injecteer 20 $\mu\text{l}$  monster in de HPLC, bij een doorvoersnelheid van ca 1,5 ml  $\text{min}^{-1}$ , druk 1000 psi.
- 5 verwijder na 30 minuten het chromatogram en spoel de kolom 15 minuten na met loopvloeistof.

**Opdracht 1: Maak in je labjournaal een duidelijke planning wanneer je het experiment gaat uitvoeren. Ga hierbij uit van het moment waarop je de HPLC hebt afgeschreven.**

## 4.6 Berekening

- 1 Bepaal de oppervlakte van de paracetamolpiek en vergelijk met de standaarden van 0, 5, 50 en 250  $\mu\text{g}$  paracetamol/ml urine die door de practicumassistent zijn gemaakt.
- 2 Bereken de concentraties van paracetamol en de verschillende metabolieten in de urine. Plaats deze resultaten in een klassikale verzameltabel.

## 4.7 Verslag

**Opdracht 2: Schrijf een kort verslag over het experiment.**

Vermeld in het verslag:

- a de gegevens die noodzakelijk zijn voor het identificeren van het monster;
- b de toegepaste methode;
- c de verkregen resultaten: het chromatogram en de berekende concentraties van paracetamol en -metabolieten.
- d de eventuele bijzonderheden tijdens de bepaling waargenomen;
- e alle niet in dit voorschrift voorgeschreven handelingen die het resultaat hebben kunnen beïnvloeden.
- f Verklaar het verschil tussen de samenstelling van urine en speeksel.

## 4.8 Literatuur

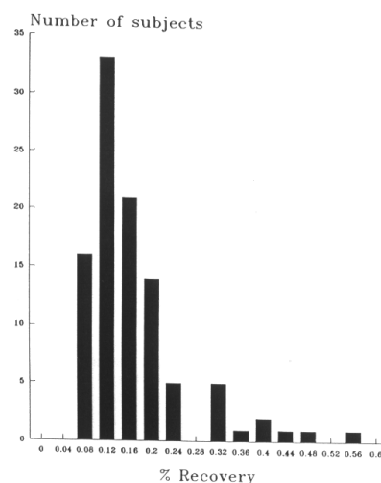
- Al-Obaidy SS, Li Wan Po A, McKiernan PJ, Glasgow JF, Millership J. (1995). Assay of paracetamol and its metabolites in urine, plasma and saliva of children with chronic liver disease. *J Pharm Biomed Anal* 13(8): 1033-1039.
- Lau GS, Critchley JA. (1994). The estimation of paracetamol and its major metabolites in both plasma and urine by a single high-performance liquid chromatography assay. *J Pharm Biomed Anal* 12(12): 1563-72.



## 5 Bepaling van de eliminatiesnelheid van bietenrood

### 5.1 Onderwerp

Roodgekleurde urine na het eten van rode bietjes zou voorkomen bij 10-14% van de gezonde populatie en komt vaker voor in het geval van ijzerdeficiëntie. Het verschijnsel wordt soms ten onrechte aangezien voor bloed in de urine, met onnodige ziekenhuisopname tot gevolg. Studies uit de zestiger jaren deden vermoeden dat het verschijnsel een autosomaal recessief overervende eigenschap is. Een recenter onderzoek (Watts, 1993) wees uit dat er van polymorfie geen sprake is, maar dat er wel sprake is van een brede interindividuele variatie. Zie figuur 1.



Figuur 1. Frequentieverdeling van de 0-8 uur recoveries (%) van betacyanine bij 100 proefpersonen na consumptie van 15 ml rodebietensap met 60 mg betacyanine.

De roodkleuring wordt veroorzaakt door de uitscheiding van de rode pigmenten die gezamenlijk worden aangeduid als betacyaninen. Let wel: er wordt slechts 0,08-0,56% van de rode kleurstof via de urine uitgescheiden. De lever speelt geen rol in het metabolisme van betacyaninen en ook in de faeces worden geen betacyaninen aangetroffen. De lage pH in de maag blijkt in hoge mate verantwoordelijk voor de degradatie van betacyaninen. Door het hoeveelheid betacyaninen in de urine te meten op verschillende momenten na inname kan de eliminatiesnelheid worden vastgesteld.

### 5.2 Toepassingsgebied

Het bepalen van de eliminatiesnelheid van geneesmiddelen is dikwijls noodzakelijk om de juiste dosering te kunnen vaststellen.

### 5.3 Beginsel

Na het slikken van een hoeveelheid rodebietensap worden op regelmatige tijdstippen urinemonsters verzameld en in het donker gekoeld bewaard. De urinemonsters worden 2× verdund met een buffer pH 5,5 een gemeten op een spectrofotometer bij een golflengte van 536 nm. Door de relatieve concentraties uit te zetten tegen de tijd kunnen de eliminatiesnelheidsconstante en de halfwaardetijd worden berekend. De eliminatiekinetiek is te vergelijken met die van paracetamol (zie §4 fig.3).

### 5.4 Toestellen en hulpmiddelen

- afsluitbare potjes van 20 ml
- afsluitbare pot van 500 ml
- maatcilinder 500 ml
- maatkolfjes 50 ml
- spectrofotometer
- reageerbuizen
- cuvetten met 1 cm lichtweg
- fosfaatbuffer 0,1 M pH 5,5
- rodebietensap, vers bereid uit gekookte rode biet

### 5.5 Werkwijze

#### **Toediening rodebietensap en verzamelen urinemonsters**

- 1 Verzamel een monster van minimaal 250 ml urine voor het slapen gaan in een afsluitbare pot en zet dit koel en donker weg (blanco).
- 2 Ledig 's ochtends de blaas volledig.
- 3 Drink op de nuchtere maag 200 ml rodebietensap en wacht nog één uur alvorens te eten; hierna kan naar believen worden gegeten en gedronken.
- 4 Probeer het eerste uur enkele malen te urineren; bepaal telkens het volume en bewaar 20 ml in een afsluitbaar potje en zet dit koel en donker weg.
- 5 Probeer vervolgens ieder uur een urinemonster te verzamelen tot 6 uur na inname. Noteer telkens de tijd en het volume.

#### **Bepaling van betacyaninen met de spectrofotometer**

- 1 Maak een ijkreeks van 3, 10, 30 en 100 µl rodebietensap in blanco urine in 50 ml maatkolfjes
- 2 Maak voor het meten de analysemonsters als volgt klaar in reageerbuizen:
  - voeg aan 3,00 ml monster 3,00 ml fosfaatbuffer pH 5,5 toe en meng
  - ijkreeks: 3,00 ml bietensapstandaard + 3,00 ml fosfaatbuffer pH 5,5
  - blanco: 3,00 ml blanco urine + 3,00 ml fosfaatbuffer pH 5,5
- 3 Verdeel de analysemonsters over twee cuvetten en lees de extinctie dus in duplo af bij 536 nm

**Opdracht 1: Maak in je labjournaal een duidelijke planning wanneer je het experiment gaat uitvoeren. Ga hierbij uit van het moment waarop je de spectrofotometer hebt afgeschreven.**



## 5.6 Berekening

**Opdracht 2: Zoek in het betreffende hoofdstuk van je toxicologieboek of -reader hoe je uit de verkregen data de eliminatiesnelheidsconstante berekent en de halfwaardetijd. Laat aan de practicumleiding zien hoe je dit gaat doen.**

## 5.7 Verslag

**Opdracht 3: Schrijf een kort verslag over het experiment.**

Vermeld in het verslag:

- a de gegevens die noodzakelijk zijn voor het identificeren van het monster;
- b de toegepaste methode;
- c de verkregen resultaten: eliminatiesnelheid en halfwaardetijd;
- d de eventuele bijzonderheden tijdens de bepaling waargenomen;
- e alle niet in dit voorschrift voorgeschreven handelingen die het resultaat hebben kunnen beïnvloeden.

## 5.8 Literatuur

- Nilsson, T. (1970). Studies into the pigments in beetroot. Langbrukshögskolans Annaler 36: 179-183.
- Watts AR, Lennard MS, Mason SL, Tucker GT, Woods HF. (1993) Beeturia and the biological fate of beetroot pigments. Pharmacogenetics 3(6): 302-11.
- Krantz C, Monier M, Wahlstrom B. (1980) Absorption, excretion, metabolism and cardiovascular effects of beetroot extract in the rat. Food Cosmet Toxicol 18(4): 363-6.



## 6 Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van *Vibrio fischeri*

### 6.1 Onderwerp en toepassingsgebied

Deze norm beschrijft een methode voor het vaststellen van de acute toxiciteit van in water opgeloste stoffen met behulp van *Photobacterium phosphoreum* (een mariene bacterie).

De norm is gebaseerd op het gebruik van commercieel verkrijgbare preparaten van geconserveerde luminescerende bacteriën, maar zullen zelf gekweekte bacteriën gebruiken, omdat er geen kwaliteitsvergelijking met andere laboratoria nodig is.

De norm is van toepassing op alle soorten water, waterige extracten en oplossingen van stoffen in water met een bekende samenstelling.

### 6.2 Termen en definities

- $EC_{20,t}$  effectieve concentratie: De concentratie van een monster of stof, uitgedrukt in respectievelijk het volumepercentage van het oorspronkelijke monster of in mg/l, waarbij de bioluminescentie met 20% is afgenomen ten opzichte van een blanco na een gegeven blootstellingsduur ( $t$ ).

#### OPMERKING

Het gebruik van de  $EC_{20,t}$  in plaats van de meer gebruikelijke  $EC_{50,t}$  waarde verhoogt de gevoeligheid van de toets terwijl door het relatief hoog oplossend vermogen van de toets de betrouwbaarheid van het resultaat weinig wordt beïnvloed.

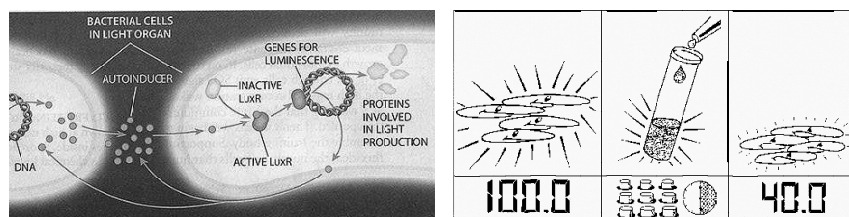
- $TI_t$  toxiciteitsindex: Het aantal malen dat een monster van onbekende samenstelling moet worden verdund om de  $EC_{20,t}$ -concentratie te bereiken.
- Reconstitutie: Reactivatie van geconserveerde luminescerende bacteriën.
- Bioluminescentie ( $I$ ): Hoeveelheid licht uitgezonden door luminescerende bacteriën als gevolg van de metabole processen en respiratie-activiteit van de bacteriën uitgedrukt in relatieve lichteenheden.
- Voorraadsuspensie: Suspensie van gereconstitueerde luminescerende bacteriën.
- Toetssuspensie: Suspensie van luminescerende bacteriën bereid uit de voorraadsuspensie.
- Blootstellingsduur ( $t$ ): tijdsduur tussen toevoeging van de verdunningsreeks van een monster aan de toetssuspensies en meting van de bioluminescentie.
- Gammawaarde ( $\Gamma$ ): Afname van de bioluminescentie van een blootgestelde toetssuspensie gedeeld door de resterende bioluminescentie.
- Monster: Watermonster, poriewater, waterig extract, waterig concentraat of oplossing van stoffen in water met een bekende samenstelling.
- Analysemonster: Een afzonderlijk gedeelte van een monster dat zal worden gebruikt voor onderzoek (NEN 6599).

- Toetsconcentratie (C): Uiteindelijke concentratie van een monster of stof waaraan de bacteriën in een toetsuspensie werden blootgesteld, uitgedrukt in respectievelijk het volumepercentage van het oorspronkelijke monster of in mg/l.

De hoogst mogelijke toetsconcentratie in deze toets bedraagt 50% van de concentratie in het analysemonster.

## 6.3 Beginsel

Als maat voor de acute toxiciteit van in water opgeloste stoffen wordt de afname van de bioluminescentie van de luminescerende bacterie *Vibrio fischeri* gebruikt. Deze bacterie soort wordt ook wel *Photobacterium phosphoreum* genoemd. De bacterie is een facultatief anaerobe gram-negatieve staaftbacterie behorend tot de familie der Vibrionaceae (Eubacteria). Luminescerende bacteriën hebben de eigenschap een deel van de uit de stofwisselingsreactie (citroenzuurcyclus) vrijkomende energie als licht af te geven. Stoffen en milieuomstandigheden kunnen het metabolisme en de hiermee verbonden lichtproductie beïnvloeden. Een door toxische stoffen veroorzaakte verandering in de stofwisselingsreactie heeft een gelijktijdige verandering in de lichtemissie tot gevolg. In de toets wordt remming van de bioluminescentie als een toxisch effect beschouwd.



Als mariene bacterie is *Vibrio fischeri* halofiel. Voorafgaande aan de toets worden daarom het monster en de verdunningsreeks op de juiste osmotische waarde gebracht. In de toets worden de bacteriën gedurende 30 min blootgesteld aan verschillende concentraties van een monster of stof. Na 5, 15 en 30 min wordt de bioluminescentie vergeleken met die in een blanco. De concentratie-effectrelatie wordt bepaald door statistische analyse. De toxiciteit van een monster of stof wordt uitgedrukt in de concentratie waarbij 20% lichtafname ten opzichte van de blanco optreedt ( $EC_{20,t}$ ). Deze waarde wordt geïnterpoleerd binnen de reeks toetsconcentraties. De toxiciteit van een monster van onbekende samenstelling wordt uitgedrukt in een toxiciteitsindex ( $TI_t$ ). Van de drie blootstellingstijden wordt die tijd waarbij de hoogste mate van toxiciteit wordt gevonden (dit komt overeen met de laagste  $EC_{20,t}$  of hoogste  $TI_t$ ) gebruikt om de uiteindelijke toxiciteit van het monster aan te geven.

## 6.4 Toestellen en hulpmiddelen

- 4.1 Toetsbacteriën: overnachtcultuur van de soort *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) (NRRL 8-11177).
- 4.2 LumisMini (Lange Groep). Lichtmeter die geschikt is om licht met een zeer lage intensiteit en een golflengte van 492 nm te meten met een solutie van circa 1%.
- 4.3 Geschikte glazen cuvetten, passend in de lichtmeter.



- 4.4 pH-meter.
- 4.5 Pipetteerspuiten met wegwerptips voor de voorgeschreven volumina.
- 4.6 Chronometer (stopwatch).
- 4.7 Natriumchloride-oplossing, 20 g/l. Deze oplossing wordt verder "verdunningswater" genoemd.
- 4.8 Natriumchloride-oplossing, 220 g/l.
- 4.9 NaOH-oplossing 1 mol/l.
- 4.10 HCl-oplossing 1 mol/l.
- 4.11 Referentiestoffen: fenol en zinknitraat p.a.
- 4.12 Toetssuspensie:  $2 \cdot 10^6$  cellen per ml verdunningswater

## 5 Werkwijze

### 5.1 Bereiding van oplossingen van stoffen in water.

De oplosbaarheid van de te onderzoeken stof in water moet voorafgaande aan de toets worden vastgesteld. Er moet onderscheid worden gemaakt tussen goed en slecht in water oplosbare stoffen. Behandel goed oplosbare stoffen volgens 5.2 en slecht oplosbare stoffen volgens 5.3.

### 5.2 Goed in water oplosbare stoffen.

Bereid een oplossing in water. Bereid een analysemonster van de verkregen oplossing volgens 5.5.

### 5.3 Slecht in water oplosbare stoffen.

Een aanmerkelijk aantal organische verbindingen zijn slecht in water oplosbaar. Bepaal welk organisch oplosmiddel het best bruikbaar is voor het oplossen van de verbinding. Voor de toets zijn onder andere ethanol, methanol, 2-propanol, aceton, tertiaire butylalcohol en dimethylsulfoxide (DMSO) geschikt. Bereid een oplossing van de slecht oplosbare stof in onverdund oplosmiddel. Maak hiervan een oplossing in water. De uiteindelijke concentratie van de verbinding mag de wateroplosbaarheid niet overschrijden. Het oplosmiddel moet in de gebruikte concentratie goed mengbaar zijn met water. De uiteindelijke concentratie van het oplosmiddel in het analysemonster moet niet hoger zijn dan 2% (V/v), hetgeen neerkomt op een maximumconcentratie van het oplosmiddel in de eigenlijke toets van 1% (V/v). Een blanco met oplosmiddel moet minder dan 10% remming van de bioluminescentie geven ten opzichte van een blanco zonder oplosmiddel (6.4). Bereid een analysemonster van de verkregen oplossing volgens 5.5. Bereid een verdunningsreeks volgens 5.6. Gebruik hierbij als verdunningswater 20 g/l NaCl (4.8) met dezelfde concentratie van het gebruikte oplosmiddel als in het analysemonster.

**Opdracht 1: Kies een stof uit die je wilt testen. Zoek in de beschikbare bronnen op hoe je veilig met deze stof moet omgaan en hoe hoog de vermoedelijke toxiciteit is. Laat aan de practicumleiding zien.**

#### 5.4 Bereiding van een verdunningsreeks

Gebruik voor de bereiding van een verdunningsreeks van het analysemonster verdunningswater (4.7). Indien een oplosmiddel is gebruikt bij het oplossen van slecht in water oplosbare stoffen, wordt verdunningswater gebruikt met dezelfde concentratie van het oplosmiddel als in het analysemonster. Bepaal proefondervindelijk in welke mate het analysemonster moet worden voorverdund voor het verkrijgen van goede resultaten. Bereid ten minste vier verdunningen met verdunningsfactor 2 of kleiner. Maak ten minste 1 ml van elke verdunning.

#### 5.5 Bereiding analysemonster

- Controleer en noteer de pH van het monster. Wanneer de pH lager is dan 6,0 of groter dan 8,0 stel deze dan bij met respectievelijk NaOH-oplossing (4.10) of HCL-oplossing (4.11) tot  $\text{pH } 7 \pm 0,5$ .

Indien er door de pH-bijstelling een neerslag ontstaat, centrifugeer dan het monster en controleer opnieuw de pH van het supernatant. Vermeld het ontstaan van een neerslag in het verslag.

- Blanco's

Voeg aan elke verdunningsreeks een blanco toe bestaande uit verdunningswater zonder toevoegingen (4.8). Indien gebruik is gemaakt van een organisch oplosmiddel, wordt tevens een blanco bestaande uit verdunningswater met een gelijke concentratie oplosmiddel getoetst.

#### 5.6 Uitvoering van de toets (zie bijlage A: werkvoorschrift LUMISmini)

Bereid en meet de toetssuspensies (4.12) met regelmatige intervallen, zodat er sprake is van gelijke blootstellingstijden in alle toetsconcentraties.

Voer de eigenlijke toets (5.6) ten minste in duplo uit met bij voorkeur afzonderlijk bereide verdunningsreeksen van hetzelfde analysemonster.

Voor de kwaliteitsborging kan als controle een reeks mee met fenol- of zinknitraatreferenties worden meegenomen.

**Opdracht 2: Maak in je labjournaal en duidelijk werkschema hoe je de proef gaat uitvoeren, met een duidelijke planning wanneer je het experiment gaat uitvoeren. Ga hierbij uit van het moment waarop je de luminometer hebt afgeschreven. Laat aan de practicumleiding zien hoe je dit gaat doen.**

- De gehele toets (bereiden van toetssuspensies, toevoegen van verdunningsreeks en blootstellingen) wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur.
- In een reeks cuvetten, in aantal gelijk aan het aantal verdunningen plus blanco, wordt 500  $\mu\text{l}$  toetssuspensie van bacteriën gepipetteerd waarin zich circa  $10^6$  bacteriecellen bevinden (4.12).
- Meet na ten minste 15 min de bioluminescentie  $I_0$  van alle toetssuspensies met de lichtmeter (4.3). Voeg onmiddellijk hierna 500  $\mu\text{l}$  van de blanco toe aan de eerste toetssuspensie en start gelijktijdig de chronometer (4.6). Voeg vervolgens in oplopende concentratie 500  $\mu\text{l}$  van elke verdunning uit de verdunningsreeks toe aan de overige toetssuspensies. Meng direct na elke toevoeging de toetssuspensies enkele malen met de pipetteerspuit.
- Meet in dezelfde volgorde de bioluminescentie van de toetssuspensies na een blootstellingsduur van 5, 15 en 30 min ( $I_5$ ,  $I_{15}$  en  $I_{30}$ ).

## 6 Toetsresultaten

**6.1 Berekening van de gammawaarden**

Voor het verkrijgen van een lineair verband tussen concentratie en effect na een gegeven blootstellingsduur ( $t$ ), wordt voor elke toetssuspensie de afname van bioluminescentie uitgedrukt in een gammawaarde  $\Gamma$ .

Bereken voor iedere blootstellingsduur de blanco afname ( $R_t$ ) met de formule:

$$R_t = \frac{I_{b,t}}{B_{b,0}}$$

waarin:

$R_t$  is de blanco-afname na een gegeven blootstellingsduur ( $t$ )

$I_{b,t}$  is de bioluminescentie van de blanco-toetssuspensie na een gegeven blootstellingduur ( $t$ )

$B_{b,0}$  is de bioluminescentie van de eerste toetssuspensie voor toevoeging van de blanco.

Bereken voor elke toetssuspensie de gammawaarde ( $\Gamma$ ) met de formule:

$$\Gamma = \frac{I_0 \times R_t}{I_t} - 1$$

waarin:

$\Gamma$  is de gammawaarde;

$I_0$  is de bioluminescentie van een toetssuspensie vóór toevoeging van een verdunning uit de verdunningsreeks;

$I_t$  is de bioluminescentie van een toetssuspensie na een gegeven blootstellingsduur ( $t$ ).

**OPMERKING**

Wanneer een bepaalde toetsconcentratie 0% of 100% remming van de bioluminescentie geeft kan geen gammawaarde worden berekend. Deze toetsconcentraties worden daarom gewoonlijk niet gebruikt bij de berekening van de concentratie-effectrelatie.

**6.2 Lineaire-regressieanalyse**

Bereken per toets de concentratie-effectrelaties voor iedere blootstellingsduur met behulp van standaard lineaire-regressieanalyse. De concentratie-effectrelatie bij een gegeven blootstellingsduur wordt beschreven door de volgende lineaire vergelijking:

$$\ln \Gamma = b \ln C + a$$

waarin:

$\Gamma$  is de gammawaarde;

$C$  is de concentratie;

$b$  is de waarde van de helling van de beschreven lijn;

$a$  is de waarde van de intercept van de beschreven lijn.

Met behulp van de kleinste-kwadratenmethode wordt de  $EC_{20,t}$  met bijbehorend 95%-betrouwbaarheidsinterval berekend waarbij:

$$C = EC_{20,t} \text{ bij } \Gamma = 0,25.$$



### 6.3 Eindresultaat

Druk de toxiciteit van het getoetste monster uit in een  $EC_{20,t}$  indien het oplossingen van stoffen in water met een bekende samenstelling betreft. Van de uit de duplotoets verkregen gemiddelde  $EC_{20,t}$ -waarden gevonden bij de drie blootstellingstijden wordt de laagste gemiddelde  $EC_{20,t}$ -waarde gebruikt om de uiteindelijke toxiciteit van het monster aan te geven.

### 6.4 Weergave van de toetsresultaten (zie bijlage B)

Tabelleer per toets de gebruikte toetsconcentraties, de gemeten bioluminescentiewaarden en de berekende gammawaarden. Rapporteer voor iedere blootstellingsduur de lineaire regressievergelijking en de  $EC_{20,t}$  met bijbehorend 95%-betrouwbaarheidsinterval. Geef voor iedere blootstellingsduur een grafische weergave van de concentratie-effectrelatie. Vermeld het eindresultaat volgens 6.3.

## 7 Voorwaarden voor geldigheid

De toets is geldig wanneer:

- de blancoafname  $Rt$  tussen 0,6 en 1,3 ligt;
- de laagste van de drie gemiddelde  $EC_{20,t}$ -waarden kan worden geïnterpoleerd;
- de  $EC_{20,t}$ -waarden van de duplotoetsen waarmee de laagst gemiddelde  $EC_{20,t}$  is berekend niet meer dan 15% hiervan afwijken;
- voor de gebruikte charge bacteriën, de  $EC_{20,5}$  voor fenol ligt tussen 3 en 10 mg/l, en/of de  $EC_{20,30}$  voor  $Zn^{++}$ -ionen ligt tussen 0,2 en 2 mg/l.
- Slecht oplosbare stoffen, vluchtige stoffen, stoffen die met verdunningswater of de toetssuspensie reageren of stoffen die tijdens de toets veranderen, kunnen de betrouwbaarheid van de toetsresultaten en de reproduceerbaarheid van de toets beïnvloeden.

## 8 Verslag

**Opdracht 3: Schrijf een kort verslag over het experiment.**

Het verslag moet de volgende gegevens bevatten:

- de toegepaste methode: volgens NVN 6516
- herkomst van de bacteriën;
- datum waarop de toets is uitgevoerd;
- datum monsternamen of monsterbereiding;
- beschrijving van de monsterbereiding;
- originele pH en getoetste pH;
- opgave van de toetsresultaten volgens 6.4;
- elke afwijking van deze norm en bijzondere omstandigheden die de analyseresultaten hebben kunnen beïnvloeden.

## 9 Literatuur

NNI (1993). Water. Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van *Photobacterium phosphoreum*. Nederlandse Voornorm NVN 6516.

- ❑ Bij het aanzetten van de LUMISmini verschijnen er op de display 4 keuzemogelijkheden nl.: 484, 488, LU en →. Recht onder de tekst zitten 4 knoppen. Elke knop komt overeen met de tekst die er boven staat. Alleen de keuze mogelijkheden 484 en LU zijn interessant voor de luminescentietest.

Bij de keuze 484 is het mogelijk om een vast aantal metingen in te stellen. Bij deze mogelijkheid wordt alleen de luminescentie na 15 minuten gemeten. Het voordeel van deze mogelijkheid is dat de berekeningen automatisch worden uitgevoerd. Het nadeel echter is, dat er tijdens de meting geen mogelijkheid meer bestaat om een cuvet opnieuw te meten wanneer deze een onbetrouwbare waarde geeft. Hierom gaat de voorkeur naar de meetmethode LU.

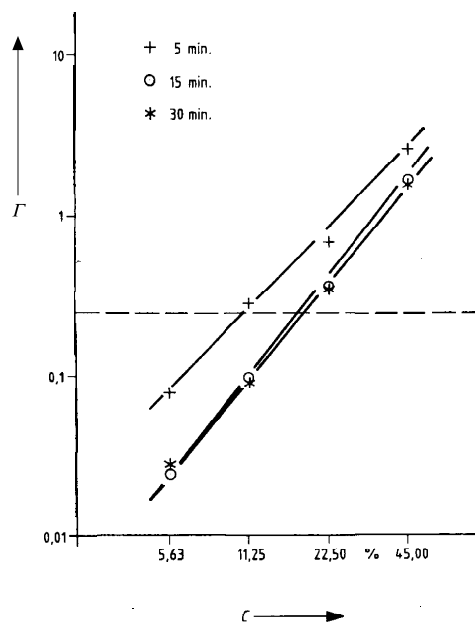
Bij LU worden de cuvetten afzonderlijk gemeten. Het is dus mogelijk om net zo veel metingen uit te voeren als je wilt. Hou er echter rekening mee dat de luminescentie op  $t = 0$  en vervolgens op  $t = 5$  minuten moet worden gemeten. Het meten van de luminescentie duurt per cuvet ongeveer 30 seconden. Voer daarom nooit meer dan 10 metingen tegelijk uit anders kom je in de knoei met de metingen bij  $t = 5$  minuten.

- ❑ De bacteriën worden gereactiveerd met 5 ml reactiveringsmedium. Dit is precies genoeg voor 9 à 10 cuvetten. Meer metingen tegelijkertijd is daarom ook uitgesloten. Voer bij elke luminescentie bepaling een blanco uit. Dit omdat er telkens andere bacteriën worden gebruikt.
- ❑ De bacteriën luminiseren alleen in de aanwezigheid van zuurstof. Zuig bij het pipetteren van de bacteriën en de monsters telkens een aantal keer met de pipet heen en terug om voldoende zuurstof in het monster te brengen.
- ❑ Zorg ervoor dat de osmotische waarde van de monsters op fysiologisch niveau (2% zeewater) is. Gebruik alleen sucrose als er een neerslag ontstaat in de monsters, anders niet!

### Uitvoering

- Druk op de knop onder LU.
- Open de klep en sluit deze weer (zonder cuvet erin).
- De bacteriën worden gedurende 15 minuten gereactiveerd met reactivervloeistof. Voor een goede reactivering moet de reactivervloeistof koud zijn ( $\pm 8^\circ\text{C}$ ). Is dit niet het geval dan vind je een relatief lage luminescentie. Als de bacteriën goed zijn gereactiveerd vindt je een waarde voor de  $I_0$  van minimaal tussen de 900 en de 1200.
- Na 15 minuten wordt de  $I_0$  van alle cuvetten als volgt bepaald:
  - zet de eerste cuvet in de LUMISmini en druk op de knop onder ↓ (de knop onder de ↑ brengt je weer terug naar het hoofdmenu)
  - schrijf de waarde van de display over. Dit omdat de waarde niet wordt opgeslagen
  - verwissel de cuvet en druk weer op de knop onder ↓
- Meet van alle 9 of 10 cuvetten de  $I_0$ . Voeg direct na het meten van de  $I_0$  het monster toe. Dit is  $t = 0$  minuten. Meet vervolgens op  $t = 5, 15$  en 30 minuten.

Bijlage B



Figuur 1. Grafische weergave van de dosis-effectrelaties bij drie blootstellingstijden van voorbeeldmonster GW10-07



## Opdrachtenformulier

		datum 1	gezien	datum 2	gezien	resultaat
Artemia	1 Range finding					
	2 Routinetest					
	3 EC <sub>50</sub>					
	4 Verslag					
Spot-test	1 ChemSafe-cursus					
	2 Risk assessment					
	3 Verslag					
Paracetamol	1 Planning labjournaal					
	2 Verslag					
Bietenrood	1 Planning labjournaal					
	2 Eliminatiekinetiek					
	3 Verslag					
Lumistox	1 Stof MSDS, toxiciteit					
	2 Planning labjournaal					
	3 Verslag					
Celkweek Hepatoma						
Cijfer						



Planning

	week 37	week 38	week 39	week 40	week 41
spot-test	<b>joris bjorn</b>	<b>ruud pim</b>	<b>ida jonate</b>	<b>dave tim</b>	
	<b>wendy lieske</b>		<b>rené marcel</b>	<b>ferry micha</b>	
bietenrood	<b>rené marcel</b>	<b>ferry micha</b>	<b>joris bjorn</b>	<b>ida jonate</b>	
		<b>wendy lieske</b>	<b>dave tim</b>		
lumistox	<b>ida jonate</b>	<b>joris bjorn</b>	<b>wendy lieske</b>	<b>rené marcel</b>	
	<b>ferry micha</b>	<b>dave tim</b>			
	<b>ruud pim</b>				
hepatoma	<b>dave tim</b>	<b>ida jonate</b>	<b>ferry micha</b>	<b>wendy lieske</b>	
		<b>rené marcel</b>	<b>ruud pim</b>	<b>joris bjorn</b>	





## Benodigdheden practicum toxicologie.

### Proef 2: de acute toxiciteit van wasverzachters bij *Artemia salina*

Datum: dinsdag 27 augustus 2002 C014

vrijdag 30 augustus 2002 D014

dinsdag 3 september 2002 C014

vrijdag 6 september 2002 D014

Tijd: dinsdag 13.00 uur, vrijdag 8.30 uur

Zaal: C014 en D014

Docent: Arthur en André

Aantal studenten dinsdag 18, vrijdag 9

#### Materiaal per tweetal per practicum

- 200 pekelkreeftjes, 24 uur oud (handleiding bij de praktikumassistent)
- 500 ml 3% zeewater (30 g keukenzout - zonder jodium! - per liter water, goed belucht, pH=8)
- SDS (natriumdodecylsulfaat)
- diverse wasverzachters
- 20 sputumpotjes
- 8 reageerbuizen
- 1 verdeelpipet 10,0 ml
- 9 verdeelpipetten 5,0 ml
- 1 verdeelpipet 1,0 ml
- 2 pasteurpipetten
- speentje
- bekersglas 100 ml
- bovenweger (nauwkeurigheid  $\leq 0,01$  g)
- ultrasone homogenisator
- watervaste viltstift
- vel logaritmisches waarschijnlijkheidspapier

**Zorg voor voldoende schone pipetten!**