

*Archieff  
C. Schipper*



# BioDetection Systems

## Validatie rapport van de DR-CALUX<sup>®</sup> assay voor sediment-extracten

**Auteurs:** Dr.Ir. H.T. Besselink  
Prof.Dr. A. Brouwer  
**Uitvoering:** Ing. Y.L. Chan  
Ing. A. Jonas  
E.C. Felzel

**Rapport:** BDS-829-VAL/rp-1

**Datum:** 6 december 2000

## Validatie rapport van de DR-CALUX<sup>®</sup> assay voor sediment-extracten

Opdrachtgever: RIKZ Jacobahaven Veldstation  
C.A. Schipper  
Jacobaweg 2  
4493 MX Kamperland  
Tel. 0113 - 377007

BioDetection Systems b.v. (BDS)  
De Boelelaan 1115  
1081 HV Amsterdam  
Tel.: +31 (0)20 4449530 / +31 (0)20 4449505  
Fax: +31 (0)20 4449553  
E-mail: [calux@biodetectionsystems.com](mailto:calux@biodetectionsystems.com)

Copyright © 2000, BioDetection Systems



Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de houder van het auteursrecht.

RIKZ zal BDS niet aansprakelijk stellen voor en vrijwaart BDS tegen alle directe of indirecte schade die zou kunnen ontstaan door toepassing van de meetresultaten door RIKZ, alsmede tegen eventuele schadeclaims van derden voortvloeiende uit het gebruik/toepassing van de meetresultaten door of namens RIKZ.

## Inhoudsopgave

<i>Samenvatting</i>	3
<i>Inleiding</i>	4
<i>Materiaal / methode</i>	4
<i>Resultaten en discussie</i>	5
<i>Literatuurlijst</i>	11
<i>Bijlagen</i>	12

## Samenvatting

In opdracht van RIKZ is het RIKZ/Standaardvoorschrift RIKZ/SPECIE-07 DR-CALUX gemodificeerd (P-BDS-9a; Besselink *et al.*, 2000) en is een analytische validatie uitgevoerd om de analysekarakteristieken van de *in vitro* bioassay te verkrijgen.

Voor validatie van de DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay zijn een drietal geëxtraheerde sedimenten tien maal geanalyseerd m.b.v. de DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay. Aan de hand van de hieruit verkregen resultaten zijn de herhaalbaarheid en het afrondingsinterval vastgesteld.

Voor het bepalen van de stabiliteit van de cellen, is de 3 pM standaard 2,3,7,8-TCDD oplossing uit de calibratiecurve geanalyseerd.

Als kwaliteitscontrole wordt aanbevolen per analyse de standaard 2,3,7,8-TCDD resultaten op een Shewart-kaart te noteren. Daarnaast wordt aanbevolen per analyse een intern referentie materiaal (IRM) op een Shewart-kaart te noteren. Het IRM bestaat uit een grote batch geëxtraheerd sediment (Peters, 2000), opgenomen in DMSO en verdeeld in kleine porties.

De analysekarakteristieken (Hermans *et al.*, 1998) die zijn vastgesteld bij de uitvoering van het gemodificeerde RIKZ/SPECIE-07 DR-CALUX (P-BDS-9a), leveren de volgende resultaten:

- De bepalingsgrens van de DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay voor sediment extracten is bepaald op 0.4 pg 2,3,7,8-TCDD TEQ per gram sediment. Deze grens geldt op voorwaarde dat ongeveer 10 gram droog sediment is opgewerkt.
- De detectielimiet van de DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay voor sediment extracten is bepaald op 0.2 pg 2,3,7,8-TCDD-TEQ per gram sediment. Deze limiet geldt op voorwaarde dat ongeveer 10 gram droog sediment is opgewerkt.
- De herhaalbaarheid vastgesteld van 3 sedimentextracten leverde een spreiding op tussen de 30 en 68%. Het vastgestelde afrondingsinterval ligt tussen 0.1 en 1.
- Bij een goed functionerende luminometer, is de gemeten luciferase activiteit bij oplopende concentraties luciferase, lineair.
- Van de voor de kwaliteitscontrole geanalyseerde standaard 2,3,7,8-TCDD oplossing (3 pM) en het IRM (M-BDS-144), zijn Shewart controlekaarten opgesteld.
- De herhaalde meting van de 3 pM standaard 2,3,7,8-TCDD oplossing voldoet aan de eisen van een Shewart controlekaart (Vijverberg en Vriezekolk, 1998). Hiermee is aangetoond dat de cellijn binnen het tijdsbestek van bepalingen stabiel is.

## Inleiding

In het kader van het te implementeren baggerspecie beoordelingsinstrumentarium heeft het RIKZ in 1999 standaardisaties, validaties, en ringtesten georganiseerd van mogelijk te implementeren *in vitro* en *in vivo* bioassays. Onderdeel van dit instrumentarium is de DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay. De DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay maakt gebruik van rat hepatoma (H4IIE) cellen die stabiel getransfecteerd zijn met een plasmide dat het gen van het vuurvliegje (*Photinus pyralis*) bevat, en fungeert als reporter gen voor de aanwezigheid van dioxine en dioxine-achtige verbindingen, gekoppeld aan DRE's (dioxin responsive elements).

Om de DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay geschikt te maken voor toepassing in de chemische Monitoring Waterstaatkundige Toestand de Lands (MWTL), dient het aangepaste Standaardvoorschrift RIKZ/SPECIE-07 (P-BDS-9a) opnieuw te worden gevalideerd.

De validatie heeft betrekking op de volgende onderdelen:

- detectielimiet en bepalingsgrens
- herhaalbaarheid
- bepaling lineariteit
- opstellen shewartkaart
- stabiliteit cellijn

## Materiaal / methode

- Extractie en opwerking van sedimenten.  
De extractie en opwerking van de sedimenten dient te worden uitgevoerd volgens het extractieprotocol TNO-MEP (Peters, 2000).
- Bepaling van 2,3,7,8-TCDD toxische equivalenten (TCDD-TEQs) in sedimenten m.b.v. de DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay. De bepaling van TCDD-TEQs in geëxtraheerde en opgewerkte sedimenten dient te worden uitgevoerd volgens de in SOP P-BDS-9a (Besselink *et al.*, 2000) gegeven methode.
- Randvoorwaarden  
Randvoorwaarden voor de in dit rapport uitgevoerde validatie van de DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay, zijn dat de sedimenten volgens SOP TNO-MEP "Opwerking van monsters sediment voor de bepaling van de aanwezigheid van dioxineachtige stoffen met behulp van DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay" (Peters, 2000) zijn geëxtraheerd en opgewerkt.
- Implementatie referentiemateriaal  
Bij iedere extractie en opwerking dient een intern referentiemonster te worden meegenomen. Dit interne referentiemateriaal (IRM) wordt vervolgens op iedere 96 wells microtiterplaat geanalyseerd. De resultaten dienen te worden genoteerd op Shewart controlekaarten. Aanbevolen wordt als IRM een grote batch geëxtraheerd sediment (SOP TNO-MEP, Peters, 2000), opgenomen in DMSO en verdeeld in kleine porties te gebruiken. Daarnaast wordt aanbevolen de resultaten van de standaard 2,3,7,8-TCDD oplossing (3 pM) uit de standaard 2,3,7,8-TCDD concentratiereeks te noteren op een Shewart controlekaart.
- Instrumentele QC borging  
Aanbevolen wordt de luminometer jaarlijkse te controleren (neem hiertoe contact op met de leverancier).



## Resultaten

### ▪ Detectielimiet en bepalingsgrens

Voor de bepaling van de detectielimiet en de bepalingsgrens van de DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay, zijn 10 standaard 2,3,7,8-TCDD calibratiecurves in triplo gemeten. Per calibratiecurve (zie figuur 1) is een detectielimiet (voor formule zie Hermans *et al.*, 1998) en een bepalingsgrens bepaald.

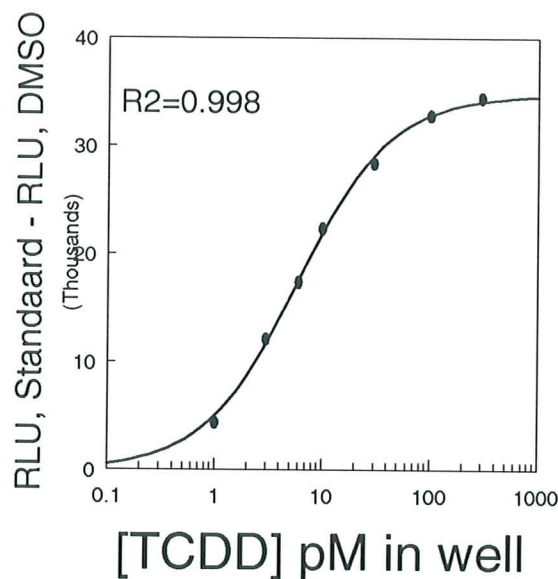
Per standaard 2,3,7,8-TCDD calibratiecurve is een detectielimiet bepaald door het gemiddelde van de triplo's plus 3\* de standaarddeviatie te berekenen (zie tabel 1; voor formule zie Hermans *et al.*, 1998). Vervolgens is de gemiddelde detectielimiet (+ stdev) van de 10 standaard 2,3,7,8-TCDD calibratiecurves bepaald.

De bepalingsgrens die door BioDetection Systems wordt aangehouden is gedefinieerd als éénmaal de RLU-waarde van de DMSO uit de standaard 2,3,7,8-TCDD concentratiereeks, geïnterpoleerd in de calibratie-curve. Per standaard 2,3,7,8-TCDD calibratiecurve is een bepalingsgrens bepaald door het gemiddelde van de triplo DMSO-RLU waarden plus 3\* de standaarddeviatie te berekenen (zie tabel 1). Vervolgens is de gemiddelde bepalingsgrens (+ stdev) van de 10 standaard 2,3,7,8-TCDD calibratiecurves bepaald.

De berekening van de detectielimiet op basis van procedure-blanco's is niet toepasbaar voor de DR-CALUX<sup>®</sup> omdat procedure-blanco's niet detecteerbaar zijn t.o.v. DMSO-blanco's.

Op basis van de uitgevoerde analyses ter bepaling van de detectie- en bepalingsgrens, wordt aanbevolen om als detectielimiet 0.3 pM 2,3,7,8-TCDD per well aan te houden. Gegeven de protocollen voor de opwerking van sedimentmonsters (Peters, 2000) en de DR-CALUX<sup>®</sup> bepaling (Besselink *et al.*, 2000), wordt aanbevolen de detectielimiet van de eindparameter op 0.2 pg 2,3,7,8 TCDD TEQ/gram sediment aan te houden.

Op basis van de uitgevoerde analyses ter bepaling van de detectie- en bepalingsgrens, wordt aanbevolen om als bepalingsgrens 1 pM 2,3,7,8-TCDD per well aan te houden. Gegeven de protocollen voor de opwerking van sedimentmonsters (Peters, 2000) en de DR-CALUX<sup>®</sup> bepaling (Besselink *et al.*, 2000), wordt aanbevolen de bepalingsgrens van de eindparameter op 0.4 pg 2,3,7,8 TCDD TEQ/gram sediment aan te houden.



Figuur 1 Voorbeeld van een standaard 2,3,7,8-TCDD calibratiecurve.

Tabel 1 Berekening van de detectie- en bepalingsgrens.

Datum bepaling	RLU DMSO	Inductie	Detectielimiet	Bepalingsgrens
15-11	2702	23	0.0363 pM in well	0.3219 pM in well
22-11	4801	13	0.0616 pM in well	0.6219 pM in well
23-11	2492	19	0.2463 pM in well	0.4902 pM in well
23-11	6444	14	0.0463 pM in well	0.6207 pM in well
28-11	2632	13	0.0572 pM in well	0.4846 pM in well
28-11	1881	16	0.0392 pM in well	0.4656 pM in well
29-11	2577	11	0.1137 pM in well	0.7868 pM in well
29-11	1282	14	0.1622 pM in well	0.8356 pM in well
29-11	3073	10	0.0438 pM in well	0.3717 pM in well
30-11	2145	13	0.0718 pM in well	0.5299 pM in well
gemiddelde	3003		0.0878 pM in well	0.5529 pM in well
Stdev	1517		0.0682 pM in well	0.1657 pM in well
Gemiddelde + 3 stdev			0.2925 pM in well	<b>1.0499</b> pM in well

#### Herhaalbaarheid

Voor de bepaling van de herhaalbaarheid van de DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay wordt gebruik gemaakt van door TNO-MEP in opdracht van RIKZ aangeleverde sediment extracten. Uit een serie van 30 sediment extracten zijn een drie-tal extracten (M-BDS-144, M-BDS-152 en M-BDS-166) geselecteerd. Deze extracten zijn gebruikt om de herhaalbaarheid en het afrondingsgetal te bepalen.

De herhaalbaarheid vastgesteld van 3 sedimentextracten, leverde een spreiding op tussen de 30 en 68%.

Aanbevolen wordt om in de range van 0.4 tot 10 pg 2,3,7,8-TCDD TEQ/g sediment een afrondingsgetal van 0.1 pg 2,3,7,8-TCDD TEQ/g sediment toe te passen

Aanbevolen wordt om bij resultaten groter dan 10 pg 2,3,7,8-TCDD TEQ/g sediment een afrondingsgetal van 1 pg 2,3,7,8-TCDD TEQ/g sediment toe te passen

Tabel 2 DR-CALUX<sup>®</sup> analyse resultaten (pg TCDD TEQ/g sediment) van tienvoudige bepalingen van 3 sediment extracten. De bovengrens is berekend volgens formule 4 van standaard voorschrift i020.90 (Vijverberg, 1997). De herhaalbaarheid is bepaald volgens formule 6 van standaard voorschrift i013.90 (Hermans *et al.*, 2000).

	M-BDS-166	M-BDS-152	M-BDS-144
	(pg TEQ/g sediment)		
Meting 1	5.13	26.38	16.68
Meting 2	5.31	27.34	29.32
Meting 3	4.13	27.32	30.03
Meting 4	2.59	21.74	18.92
Meting 5	4.08	26.41	23.56
Meting 6	3.52	22.77	19.58
Meting 7	4.66	28.11	24.79
Meting 8	2.46	28.79	25.14
Meting 9	3.78	26.13	18.32
Meting 10	4.61	22.27	24.25
<b>Gemiddelde</b>	4.03	25.73	23.06
<b>Standaard deviatie</b>	0.97	2.54	4.59
<b>Bovengrens</b>	0.49	1.27	2.29
<b>Afrondingsinterval</b>	0.1	1	1
<b>Herhaalbaarheid</b>	68%	30%	56%

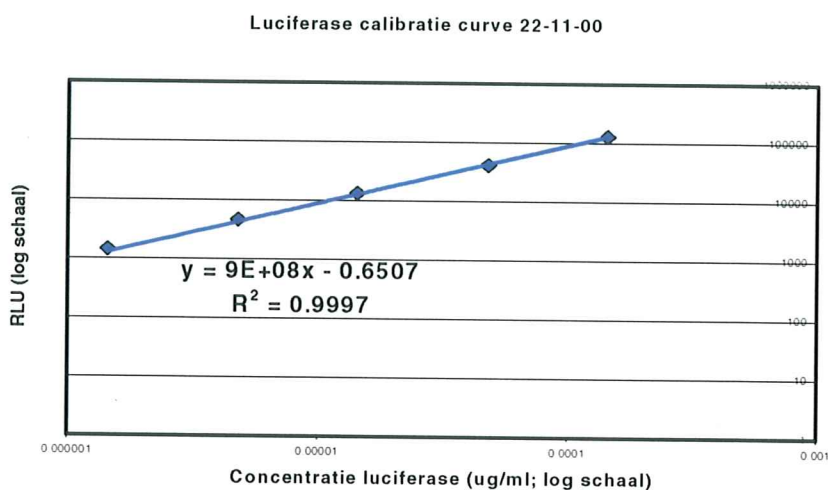
#### ▪ Bepaling lineariteit

Voor de bepaling van de lineariteit van de luminometer wordt de activiteit van verschillende luciferase concentraties gemeten. Hiertoe is een luciferase stockoplossing gemaakt door 1 µl van een luciferase oplossing (Promega, E170, Lot No. 102595, 13 mg luciferase/ml) te pipetteren in 1 ml lysis-mix, aangevuld met 1 mg BSA (Bovine albumine). Van de stock zijn vervolgens een viertal verdunningen gemaakt waarvan vervolgens de activiteit is bepaald (tabel 3).

Aanbevolen wordt de lineariteit van de luminometer 2 keer per jaar te controleren. Indien de controles afwijkingen opleveren, dient contact te worden gezocht met de leverancier van de luminometer voor onderhoud.

Tabel 3 Gemeten Relative Light Units (RLU) als functie van de luciferase concentratie.

Lucifease concentratie (µg/ml)	Gemiddelde RLU	Percentage stdev
4.31E-06	1442	1.5
1.44E-05	4677	3.1
4.31E-05	13410	1.4
1.44E-04	41070	6.1
4.31E-04	128596	15.5



Figuur 2 Relative Light Units (RLU) als functie van de luciferase concentratie.

▪ **Opstellen Shewart controlekaarten**

Voor de constructie van Shewart controlekaarten wordt gebruikt gemaakt van monster M-BDS-144 en de 3 pM standaard 2,3,7,8-TCDD oplossing (Vijverberg en Vriezolk, 1998). De Shewart controlekaarten dienen als QC om vast te stellen of de resultaten de grenzen van de Shewart controlekaarten overschrijden.

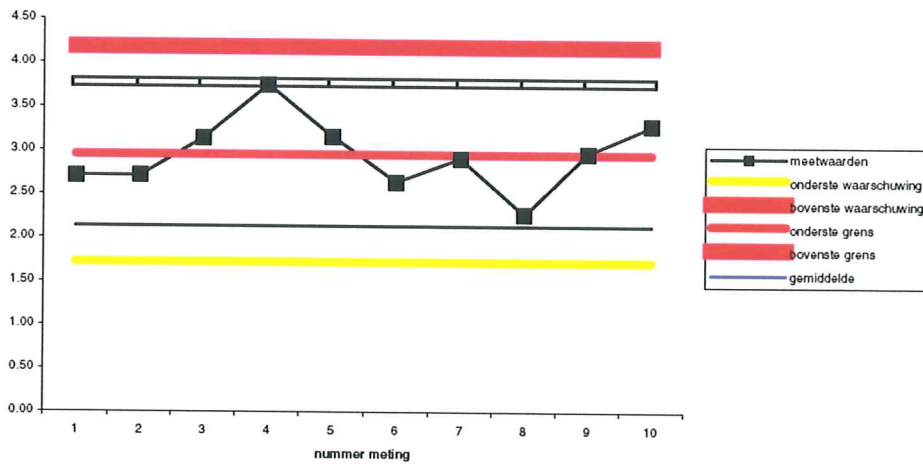
Aanbevolen wordt om voor de constructie van een Shewart controlekaart een IRM en de 3 pM standaard 2,3,7,8-TCDD oplossing te gebruiken.



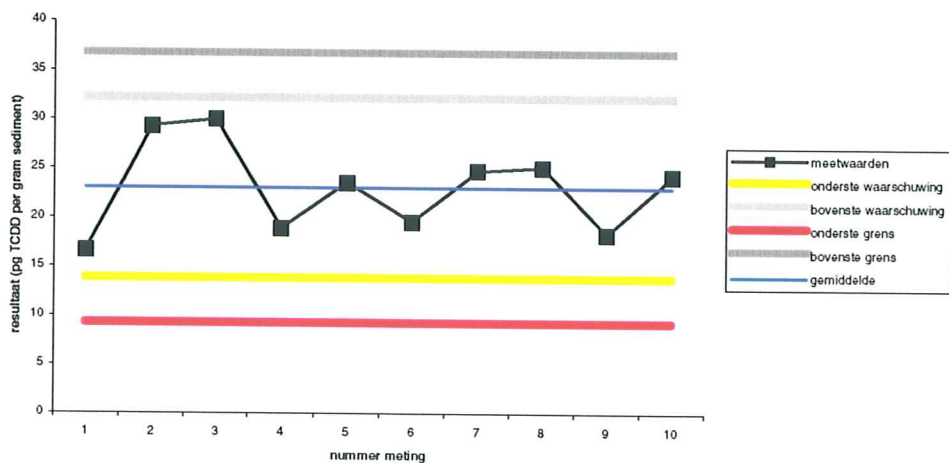
Tabel 4 DR-CALUX® respons (pg 2,3,7,8-TCDD TEQ/g sediment) van de 3 pM standaard 2,3,7,8-TCDD oplossing en monster M-BDS-144.

3 pM TCDD standaard (pM in well)				TCDD-TEQ M-BDS-144 (pg TCDD/gram sediment)		
	datum	TEQ	persoon	datum	TEQ	persoon
Waarde1	15-11	2.71	a	15-11	16.68	a
Waarde2	23-11	2.72	b	22-11	29.32	a
Waarde3	22-11	3.14	a	23-11	30.03	b
Waarde4	23-11	3.75	a	23-11	18.92	a
Waarde5	28-11	3.16	b	28-11	23.56	b
Waarde6	28-11	2.64	a	28-11	19.58	a
Waarde7	29-11	2.91	b	29-11	24.79	b
Waarde8	29-11	2.27	c	29-11	25.14	c
Waarde9	29-11	2.97	a	29-11	18.32	a
Waarde10	30-11	3.29	a	30-11	24.25	a
Gem. stdev		2.96 0.41			23.06 4.59	

shewartkaart 3 pM standaard



shewartkaart m-bds-144



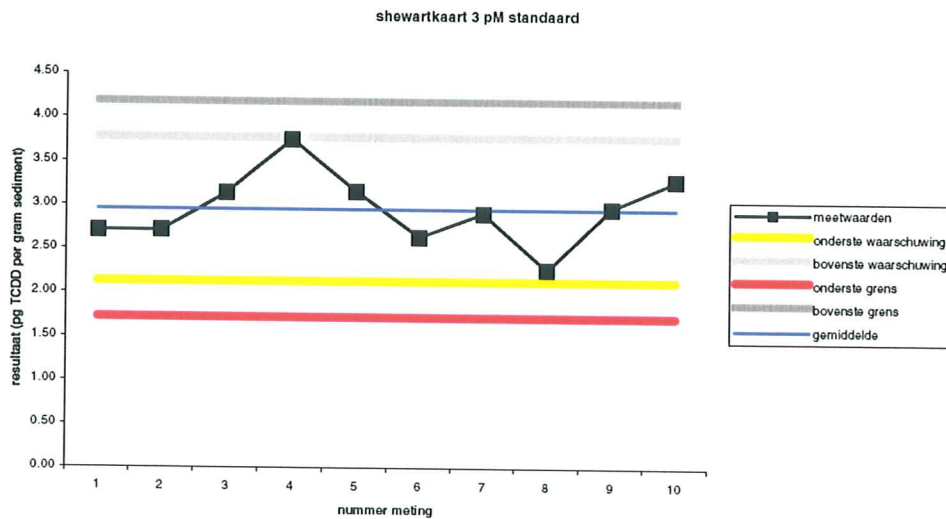
▪ **Stabiliteit cellijn**

Voor het monitoren van de stabiliteit van de cellen, wordt de 3 pM standaard TCDD-oplossing uit de calibratie-curve in de loop van de tijd geregistreerd en op een Shewart controlekaart genoteerd (Vijverberg en Vriezekolk, 1998).

De Shewart controlekaart van deze analyses dient als QC om vast te stellen of de cellijn stabiel blijft (> 3S grens). Bij afwijkende resultaten wordt aanbevolen een nieuwe batch DR-CALUX<sup>®</sup> cellen te ontdooien en in gebruik te nemen (zie P-BDS-9a, bijlage 3).

Tabel 5 DR-CALUX<sup>®</sup> response (pM 2,3,7,8-TCDD TEQ/g sediment) van de 3 pM standaard TCDD oplossing.

3 pM TCDD standaard (pM in well)			
	datum	TEQ	persoon
Waarde1	15-11	2.71	a
Waarde2	23-11	2.72	b
Waarde3	22-11	3.14	a
Waarde4	23-11	3.75	a
Waarde5	28-11	3.16	b
Waarde6	28-11	2.64	a
Waarde7	29-11	2.91	b
Waarde8	29-11	2.27	c
Waarde9	29-11	2.97	a
Waarde10	30-11	3.29	a
Gem.		2.96	
stdev		0.41	



## Literatuurlijst

Besselink, H., Jonas, A. en Felzel, E. (2000) Bepaling van 2,3,7,8-TCDD toxische equivalenten (TCDD-TEQs) in sedimenten met behulp van de DR-CALUX<sup>®</sup> (Chemical Activated Luciferase gene eXpression) bioassay; BioDetection Systems; P-BDS-9; versie a.

Hermans, J.H., van de Zande, A.E. en Wilts, W. (1998) Validatie van analysemethode; Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ; nr. I013.90; versie 1.0.

Peters, R. (2000) Opwerking van monsters sediment voor de bepaling van de aanwezigheid van dioxineachtige stoffen met behulp van DR-CALUX<sup>®</sup> bioassay; TNO milieu, energie en procesinnovatie.

Vijverberg, F.A.J.M. (1997) Het opstellen van analyse karakteristieken; Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ; nr. i020.90; versie 2.0.

Vijverberg, F.A.J.M., Vriezekolk, G.H. (1998) Het opstellen en toepassen van de Shewhart controlekaarten; Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ; nr. I009.90; versie 1.0.

## Bijlage 1

### Analyse karakteristieken

01	Parameter Matrix	TCDD-TEQ's in sediment
02	Analysevoorschrift	Nummer :P-BDS-9 Versie :a Datum :november 2000
03	Testcode	
04	Beginsel van de methode	In genetische gemodificeerde cellen die bloot worden gesteld aan het opgewerkte extract, kan onder invloed van de aanwezigheid van dioxines en/of dioxine-achtige verbindingen, het enzym luciferase tot expressie komen. De test wordt uitgevoerd in een 96 well microtiterplaat waarbij naast de te testen monsters een standaard 2,3,7,8-TCDD concentratiereeks wordt meegenomen. Door interpolatie van de respons van een monster in de 2,3,7,8-TCDD calibratiecurve, kan de hoeveelheid TCDD-TEQs in het monster (pg TCDD-TEQ/g droog sediment) worden bepaald.
05	Configuratie apparatuur	Luminometer: Anthos Lucy1 Dataverwerking: PC met Microsoft windows en excel
06	Monster voorbereiding	procedure vriesdrogen, extractie en clean-up van sedimenten" TNO-MEP (zie bijlage 2)
07	Monsteropslag	Na opwerking en opgenomen in DMSO, een half jaar op kamertemperatuur. Opm: de vials dienen goed te zijn afgesloten!
08	Meetbereik	Van detectiegrens tot EC <sub>50</sub>
09	Kalibratie	2,3,7,8-TCDD: 8 concentraties
10	Detektiiegrens	DR-CALUX: 0.3 pM 2,3,7,8 TCDD in well Eindparameter: 0.2 pg TCDD TEQ per gram sediment
11	Bepalingsgrens	DR-CALUX: 1 pM 2,3,7,8 TCDD in well Eindparameter: 0.4 pg TCDD TEQ per gram sediment
12	Afrondingsgrens LABINSYS	In de range van 0.4 tot 10 pg/g: 0.1 pg 2,3,7,8-TCDD TEQ per gram sediment In de range van .10 en hoger pg/g: 1 pg 2,3,7,8-TCDD TEQ per gram sediment
13	Herhaalbaarheid	< 68%
14	Reproduceerbaarheid	n.v.t.
15	Terugvinding	n.v.t.
16	Referentiemateriaal	Sediment extract:
17	Controlekaarten	-3 pM punt van de calibratie-curve -Intern Referentie Materiaal
18	1 <sup>o</sup> lijn controle	Sediment extract ;Blanco-procedure
	2 <sup>o</sup> lijn controle	
	3 <sup>o</sup> lijn controle	
19	Storende componenten	Sedimenten kunnen een dusdanig hoeveelheid zwavel bevatten dat deze cytotoxisch is voor de cellen hiertoe moeten het sediment ontzwaveld worden



## Bijlage 2

Ruwe data standaard 2,3,7,8-TCDD concentraties (resultaat in RLU's).

Datum	persoon	0 pM	1 pM	3 pM	6 pM	10 pM	30 pM	100 pM	300 pM
15-11-00	a	2667	8254	20480	28135	41708	54964	59584	69683
		2618	8538	20134	34621	45506	57136	63794	70580
		2820	8835	19883	30524	41830	57763	61944	64162
22-11-00	a	4985	9717	24564	33847	42010	54279	65191	66039
		4768	9216	22794	32516	40520	56687	61730	67389
		4649	8919	22577	33339	39156	54901	60650	64204
23-11-00	b	2007	5067	13361	20656	28383	38170	48252	48531
		2651	5325	14138	20933	31182	41325	52120	51551
		2818	5062	13549	21772	28030	42566	43838	42982
23-11-00	a	6597	11328	26872	40482	51862	68441	82418	80222
		6476	12933	30160	45353	61257	79871	91898	95804
		6258	14426	28556	48583	62456	76903	90769	93824
28-11-00	b	2511	6828	15139	20142	24942	31040	35135	37812
		2729	7242	14702	20076	25213	30899	36192	37229
		2656	6947	14366	19797	24753	31040	34970	36185
28-11-00	a	1925	5225	12457	16380	19450	26325	31476	31462
		1901	4053	12032	16165	18618	25827	29657	29565
		1818	4185	12513	14772	17054	25870	28582	30280
29-11-00	b	2726	5517	10681	15161	18663	23864	28958	26582
		2543	5319	9641	14083	17219	22949	27067	26998
		2461	5040	9934	13520	17876	24446	26700	27057
29-11-00	a	1224	3664	8296	11079	13711	15416	18575	17558
		1293	3624	7696	10793	14048	16788	18964	18175
		1330	3745	8251	11130	14070	17254	18186	18718
29-11-00	c	3277	5580	10246	16795	21550	27945	30185	33341
		3095	5613	10040	17816	22170	27657	31912	32991
		2846	5325	10272	16857	22300	28160	27362	34476
30-11-00	a	2236	5008	12064	16065	19083	24970	29956	29854
		2032	5029	11799	15153	20344	25307	28060	30066
		2166	4881	11121	15062	19708	24201	28716	28354

### Bijlage 3

Ruwe data monsters (resultaat in RLU's).

		Procedure DMSO	M-BDS-144	M-BDS-152	m-bds-166
a	15-11-00	2667	28793		
		2618	29039		
		2820	29396		
a	21-11-00	7331		44848	18250
		6853		45040	18601
		6594		48681	18892
a	23-11-00	2423	24934	22855	7037
		2401	23946	23289	6894
		1525	23104	22493	7299
a	22-11-00	4331	35093	34965	14135
		4510	33977	33144	13195
		4652	36918	34636	14409
a	23-11-00	17963	54963	53888	24610
		17519	48782	52256	23495
		15498	45625	51955	22952
b	28-11-00	3719	21357	22188	8993
		3847	21136	22003	8919
		3837	20739	22043	8788
A	28-11-00	2414	14180	15068	6145
		2384	14663	15052	5260
		2534	15226	17247	5991
B	29-11-00	3002	13826	14856	5908
		2691	14968	15169	6436
		2816	15693	16919	7075
C	29-11-00	2896	17459	17460	5682
		3108	17123	18143	5302
		2987	16067	18161	4967
A	29-11-00	1718	10767	11411	4387
		1631	9790	11416	4246
		1562	10288	12710	5058
A	30-11-00	2621	16604	16800	6939
		2643	16182	14187	6782
		2720	15971	15999	7078

Note: alle monsters zijn 10\* verdund voor DR-CALUX<sup>®</sup> analyse. De hoeveelheid opgewerkt sediment van monsters M-BDS-144, M-BDS-152 en M-BDS-166 is respectievelijk 9.98, 9.99 en 10.04 g.

## Bijlage 4

Ruwe data luciferase calibratie curve (resultaat in RLU's).

conc luciferase	1.43E-06	4.78E-06	1.43E-05	4.78E-05	0.000143
RLU1	1467	4833	13311	38903	112211
RLU2	1426	4648	13286	43818	150873
RLU3	1434	4551	13634	40488	122705