D 619

Invloed van natuurlijk UV-B straling op picofytoplankton-populaties bij Curaçao

M. Karin de Boer, Peter Boelen en Anita G.J. Buma

1996/1997

Rijks *universiteit* Groningen, Vakgroep Marine Biologie, Biologisch Centrum, Postbus 14, 9750 AA Haren, Nederland

INHOUD

Tankwurd 2

Samenvatting 3

Introductie 4

Materiaal en Methoden
Veldwerk
Monsterpunten 7
Biodosimeter 9
Lichtmetingen 9
Veldmonsters 10
Maat voor yellow substance 11
Incubatie experimenten 11
Bepaling van DNA schade
DNA isolatie 12
DNA kwantificatie 12
DNA schade 13

Resultaten
Biodosimeter 15
Maat voor yellow substance 16
Windsnelheden tijdens de monsterdagen 16
Veldmonsters 17
Incubatie experimenten 20

Conclusies en discussie 24

Literatuur 28

Tankwurd

Alhewol't mannichfâldich sûchsels sa altemets hat sitten it yntsjaasjen oer de fûleindich warberens dy't Peter & ik útsnijje as moai waar bibloechen, binne der lykwols hiel wat mânsken dy ik tankjé wol foar it slagjen fan de hele ûnderneming.
Aldereerst wie ik de grûnswacht & de Cargo in plom faam foar it útsetten fan de opeartacht oer it hele eitân. Yn in pear dagen wie hast hiel Curaçao behânt gesiet.
Fierder wie ik alle meiwerkers fan Stichting CARMABI tankjé foar hun stipe & meiwerking, yn it besûnder Oskar as kaptein, fisk- en marenguemaster. Us kollega's Fleur, Petra (NIOZ, Texel), Ingrid & Gerhard (U.f.W. Wenen) tankjé foar de nijfiike gearwerking.
Tagelijk wiene se de meibewenners fan CARMABI tegearre mei Wobbie, Yvon, Martyn, Eveline, Peter, Mark, Joost & Susan. Elkeanien meimechoar tanke foar de smite út-, dûk-, fisk-, klim-, wein-, duins-, drink- en barbecue tiid nêst de drukke wirkdagen.
Werom yn Nederlân wiet it nijfiik arbeidzjen yn it mikroalgen lab (Nancy, Anita & Leen!) en op é âfdeling Marieke Bibloechd ha 'K in hiel aardiche tiid hân.
Sûnder de finansiele stein fan it van Fedinfonds en de STIK wie ik nea op Curaçao bedarre en ik woe harren dan ek tankjé foar de bydrage.
Lang om let woe ik Peter tankjé, sûnder him wie ik nea op it idee kommen om nei Curaçao te gean. Peter, tanke foar de goeie begeidning en de geselligge gearwerking & speeldeal foar dy't hiele tankwurd yn 't fisk (of dat wat dir in bytsjé op lytet!)

SAMENVATTING

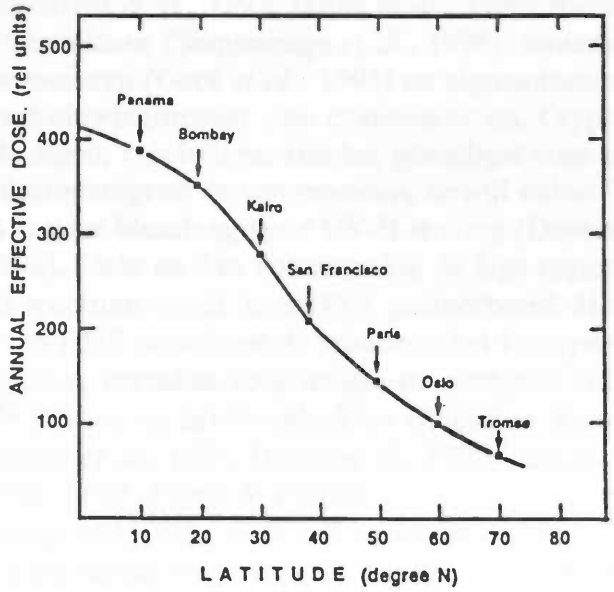
Tijdens een veldwerkperiode op Curaçao is gekeken naar UV-B straling als natuurlijke stressfactor in picofytoplankton-populaties. Tevens werd onderzocht hoe diep UV-B straling doordringt in de verschillende watertypes rond Curaçao.
De uitdoving van UV-B straling bleek sterk afhankelijk van het watertype. In het heldere oligotrofe oceaanwater drong UV-B straling tot dieper dan 10 meter door. In eutroof tropisch water werd al na enkele meters geen UV-B straling meer waargenomen.
UV-B specifieke DNA schade was duidelijk aantoonbaar in de verschillende grootte fracties van het plankton. De meeste DNA schade werd gemeten in de kleinste fractie (tot 1 μm). Een soortenindicatie van de verzamelde watermonsters zou een indruk kunnen geven welke soorten plankton door UV-B straling worden gestresst.
Onder de 1% diepte van UV-B straling van elk watertype werd DNA schade gemeten, mixing zou hiervan de oorzaak kunnen zijn.
Wanneer mixing werd uitgeschakeld door monsters te incuberen in UV-doorlatende plastic zakken nam in de loop van de dag de DNA schade toe op dieptes waar nog UV-B straling aanwezig was. Afname in de DNA schade laat zien dat waarschijnlijk de organismen van beide grootte fracties DNA schade kunnen reparen, waarbij lichtreparatie het effectiefst lijkt te zijn.

INTRODUCTIE

Het aantal studies naar de gevolgen van de afbraak van stratosferisch ozon neemt de laatste jaren steeds meer toe. De interesse is hierbij vooral gericht op de effecten van de sterk toenemende natuurlijke UV-B straling, als gevolg van de afbraak van ozon. Zonnestraling, welke het aardoppervlak bereikt, bestaat uit ultraviolette (UV) straling, zichtbaar licht (PAR = photosynthetically active radiation, 400-750 nm) en infrarode straling (> 750 nm). UV-straling is onder te verdelen in UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) en UV-C (200-280 nm). De UV-straling die het oppervlak van de aarde bereikt heeft een golflengte van ongeveer 290-400 nm, het UV-B en UV-A gedeelte van het spectrum (Urbach en Gange, 1986). De schadelijke effecten van UV-straling op organismen stijgen sterk met afnemende golflengte (Laurion *et al.*, 1997). UV-C straling is daardoor potentieel zeer schadelijk, maar komt in de natuur niet voor.

De ozonconcentratie in de stratosfeer is voornamelijk in de polaire en gematigde gebieden aan het afnemen (Farman et al., 1985; Crutzen, 1992; Stolarski,1992; Weiler en Penhale,1994). Bij deze ozonafbraak kan meer UV-B straling (van kortere golflengtes) het aardoppervlak breiken (Roy *et al.*, 1994; Madronich, 1995). Op UV-A straling heeft de ozonafbraak geen zichtbaar effect. De consequenties van de toename van UV-B straling in een aquatisch ecosysteem is moeilijk voorspelbaar, een aantal studies laten een afname van soortendiversiteit, een verschuiving van de soortensamenstellingen, en een afname van de gehele produktiviteit zien (Worest, 1981; Worrest *et al.*, 1987; Bidigare, 1989; Bothwell *et al.*, 1993; Behrenfeld *et al.*, 1994).

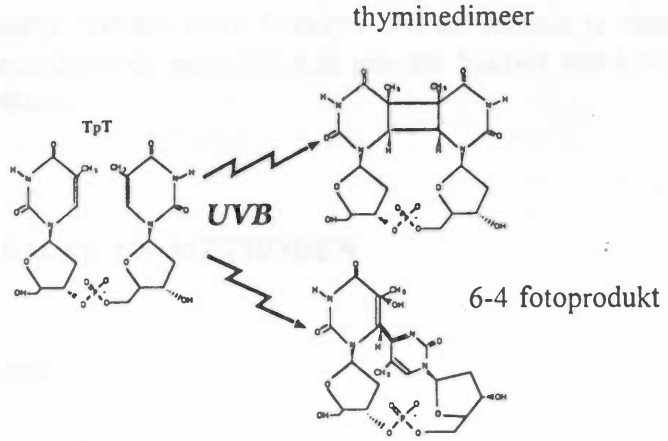
De zonnestand en de breedtegraad zijn ook factoren die de mate van UV-straling op het aardoppervlak bepalen. In het tropisch gebied is de jaarlijkse biologische effectieve UV-dosis 4 maal zo hoog dan in de gematigde en polaire gebieden (figuur 1), terwijl in de tropen nauwelijks afbraak van ozon plaatsvindt (Madronich, 1992).



Figuur 1. De jaarlijkse effectieve UV-dosis uitgezet tegen de breedtegraden (Curaçao; 12° en Nederland, Groningen; 53°15', uit Dahlback *et al.*, 1989).

UV-straling kan diep doordringen in de eufotische zone van een aquatisch milieu, veel dieper dan in eerste instantie werd verwacht (Gieskes en Kraay, 1990; Karentz en Lutze, 1990; Smith *et al.*, 1992). In helder oligotroof water dringt natuurlijke UV-straling door tot dieptes van 20-30 meter (Jerllov, 1950; Fleischmann, 1986; Karentz en Lutze 1990; Smith *et al.*, 1992; Aas *et al.*, 1997). De intensiteit van UV-straling in de waterkolom is sterk afhankelijk van onder andere de diepte en het watertype (Helbling *et al.*, 1992; Scully en Lean, 1994). De hoeveelheid organisch materiaal (o.a. DOM, POM en algen) bepaald in de waterkolom de spectrale samenstelling van UV straling, water wat rijk is aan DOM absorbeert efficiënt UV-straling (Scully en Lean, 1994; Laurion *et al.*, 1997).
UV-B straling veroorzaakt een breed scala aan direkte en indirekte effecten op aquatisch biota (Williamson en Zagares 1994). Fytoplankton blijkt te worden gestresst door UV-B straling, zelfs onder normale ozon condities (Worrest, 1983; Helbling *et al.*, 1992; Behrenfeld *et al.*, 1993). Deze organismen vormen samen met bacterioplankton de basis van de oceanische voedselwebben. Produktiviteitmetingen van deze gemeenschappen kunnen gevoelige indicatoren zijn van de toenemende UV-B straling op het aardoppervlak. Naast de direkte invloed van UV-B straling op het fytoplankton, kunnen de effecten van UV-B straling op bacteriële activiteit (Herndl *et al.*, 1993; Wetzel *et al.*, 1995), trofische interacties (Bothwell *et al.*, 1993; Bothwell *et al.*, 1994) en de chemische samenstelling van het zeewater (Palenik *et al.*, 1991) ook veranderingen veroorzaken in de fytoplanktonproduktie.
PAR en UV-A straling hebben betrekking op zowel reparatie/herstel als schade van fytoplankton (Karentz *et al.*, 1994; Quesada *et al.*, 1995). UV-A straling kan indirekt schade veroorzaken aan DNA door o.a. het vormen van radicalen zoals zuurstof- en hydroxylradicalen (Peak en Peak, 1989).
UV-B straling kan invloed hebben op het fotoapparaat van het fytoplankton (El Sayed *et al.*, 1990; Cullen en Lesser, 1991; Helbling *et al.*, 1992, Lesser *et al.*, 1994) en daardoor op de snelheid van fotosynthese. Andere effecten zijn; een afname in groeisnelheid (Jokiel en York, 1984; Karentz, 1991; Behrenfeld *et al.*, 1992; Buma *et al.*, 1997), beweegbaarheid (Häder, 1993) en opnamecapaciteit van nutriënten (Döhler en Stolter, 1986; Döhler *et al.*, 1991; Behrenfeld *et al.*, 1995). In de planktoncel treden er verder veranderingen op in celvolume (Karentz *et al.*, 1991; Behrenfeld *et al.*, 1992, Buma *et al.*, 1996; Buma *et al.*, 1997), ultrastruktuur (Sommaruga *et al.*, 1996), samenstelling van de aminozuren (Goes *et al.*, 1995) en pigmentsamenstelling. De schaduwpigmenten van cyanobacterien, Cryptophyceae en rode algen, fycobilines, zijn het gevoeligst voor UV-B straling, daaropvolgend de carotenoiden, terwijl chlorofyl het resistents is voor bleaching door UV-B straling (Donkor en Häder, 1996). Licht en dan voornamelijk de lage regionen van het UV-B spectrum wordt door DNA geabsorbeerd. Het ontstaan van DNA schade en de schade in het fotosysteem zijn de belangrijkste oorzaken voor lethale en mutagene effecten van UV-B straling op het fytoplankton (Zolzer en Keefer, 1989; Karentz *et al.*, 1991; Buma *et al.*, 1995; Aas *et al.*, 1996; Jeffrey *et al.* 1996a & 1996b).
Dit onderzoek richt zich op de schade in het DNA die door UV-B straling wordt veroorzaakt. De meest voorkomende fotoreaktie is dat UV-B straling het DNA direkt beschadigt door het induceren van dimerisatie tussen twee naast elkaar gelegen pyrimidine basen. De twee meest voorkomende fotoprodukten zijn thyminedimeren en 6-4 fotoprodukten

(figuur 2). Tussen beide fotoprodukten is een significant verschil in formatie en struktuur, wat betekend dat beide produkten verschillen in moleculaire en biologische effecten. Overeenkomstig is dat beide fotoprodukten de DNA synthese en gentranscriptie remmen (Mitchell, 1988; Mitchell en Nairn, 1989). 6-4 Fotoprodukten worden langzamer geinduceerd dan thyminedimeren, 15-30 % van de inductiesnelheid van thyminedimeren (Mitchell *et al.*, 1990). Door de hogere inductiesnelheid zijn thyminedimeren de meest voorkomende fotoprodukten. Met onder andere de immunoslotblot techniek is de hoeveelheid thyminedimeren in het DNA te kwantificeren.



Figuur 2. De door UV-B straling geinduceerde vorming van DNA fotoprodukten; thyminedimeren en 6-4 fotoprodukten, uit twee naastelkaar gelegen pyrimidinebasen.

De mate van DNA schade en het type DNA schade is een functie van de golflengte en de intensiteit van blootstelling (Jeffrey *et al.*, 1996a & 1996b). Algen kunnen zich beschermen tegen UV-B straling door de morfologie aan te passen, door te migreren of door het vormen van schaduwpigmenten en kleurloze UV-absorberende stoffen (Jeffrey *et al.*, 1996a & 1996b). De algen zijn tot op een zekere hoogte in staat de DNA schade te repareren (Sancar en Sancar, 1988). Wanneer echter het aantal fotoprodukten in het DNA te hoog wordt is de cel door deze schade niet meer in staat tot transcriptie en replicatie van het DNA. Het gevolg hiervan is een verminderde groei en een verlaagde fotosynthese. Het reparatiemechanisme voor DNA schade wordt tevens geremd, wat leidt tot verdere ophoping van fotoprodukten wat weer kan leiden tot lethale en mutagene effecten. Lichtreparatie, donkerreparatie zijn de twee belangrijkste reparatiemechanismen. Lichtreparatie gaat het snelst maar treedt alleen op in aanwezigheid van PAR en/of UV-A straling. Voor deze foto-enzymatische reparatie is waarschijnlijk een enkel enzym nodig, fotolyase (Karentz *et al.*, 1991). Donkerreparatie is complexer en heeft meer tijd nodig voordat het geïnduceerd wordt (Mitchel en Nairn, 1989).

De van nature hoge UV-B straling, het heldere water en het vrijwel constante licht- en temperatuurregime in de tropen vormen een goed uitgangspunt om de invloed van UV-B straling in een onveranderd aquatisch systeem te onderzoeken. De lichtcondities in de tropische zeeen zijn optimaal voor fytoplanktongroei. De belangrijke component van het fytoplankton in oligotrofe tropische wateren is het picofytoplankton (Li *et al.*, 1983). Picofytoplankton bestaat uit microalgen met een afmeting van 0.2 tot 2 μm en staat aan de basis van de voed-

selketen. In sommige oligotrofe wateren is het picofytoplankton verantwoordelijk voor 90% van de primaire produktie. De invloed van hoge natuurlijke UV-B stralingsintensiteit op deze algen is nagenoeg onbekend. Uit onderzoek is gebleken dat andere organismen in de tropen worden beïnvloed door de van nature hoge UV-B straling (Lesser *et al.*, 1990; Jeffrey *et al.*, 1995). Door de grote omvang van de produktie van biomassa door het picofytoplankton zouden kleine variaties in UV-B intensiteit mogelijk kunnen leiden tot grote veranderingen in het gehele ecosysteem in deze wateren.
In deze studie werd gekeken hoe diep UV-B straling doordringt in verschillende watertypes in de tropen. Verder werd onderzocht of UV-B straling een stressfactor is voor picofytoplankton in de bovenste waterlagen van het heldere tropische oceaanwater. Tevens werd bekeken wat de variatie is tussen UV-tolerantie in de verschillende grootte fracties van het picofytoplankton.

MATERIAAL EN METHODEN

Veldwerk

Monsterpunten

Het veldwerk vond plaats in de periode van 18 oktober 1996 tot 10 december 1996 op Curaçao, de Nederlandse Antillen. Deze periode valt in de 'regentijd'. De passaat wind die buiten het regenseizoen voornamelijk hard uit noordoostelijke richting waait zou in deze periode minder van kracht moeten zijn. Stratificatie zou dan kunnen optreden omdat de mixing van de waterkolom minder is. Annabaai, Pestbaai en Open Oceaan werden als monsterpunten gekozen (figuur 3).

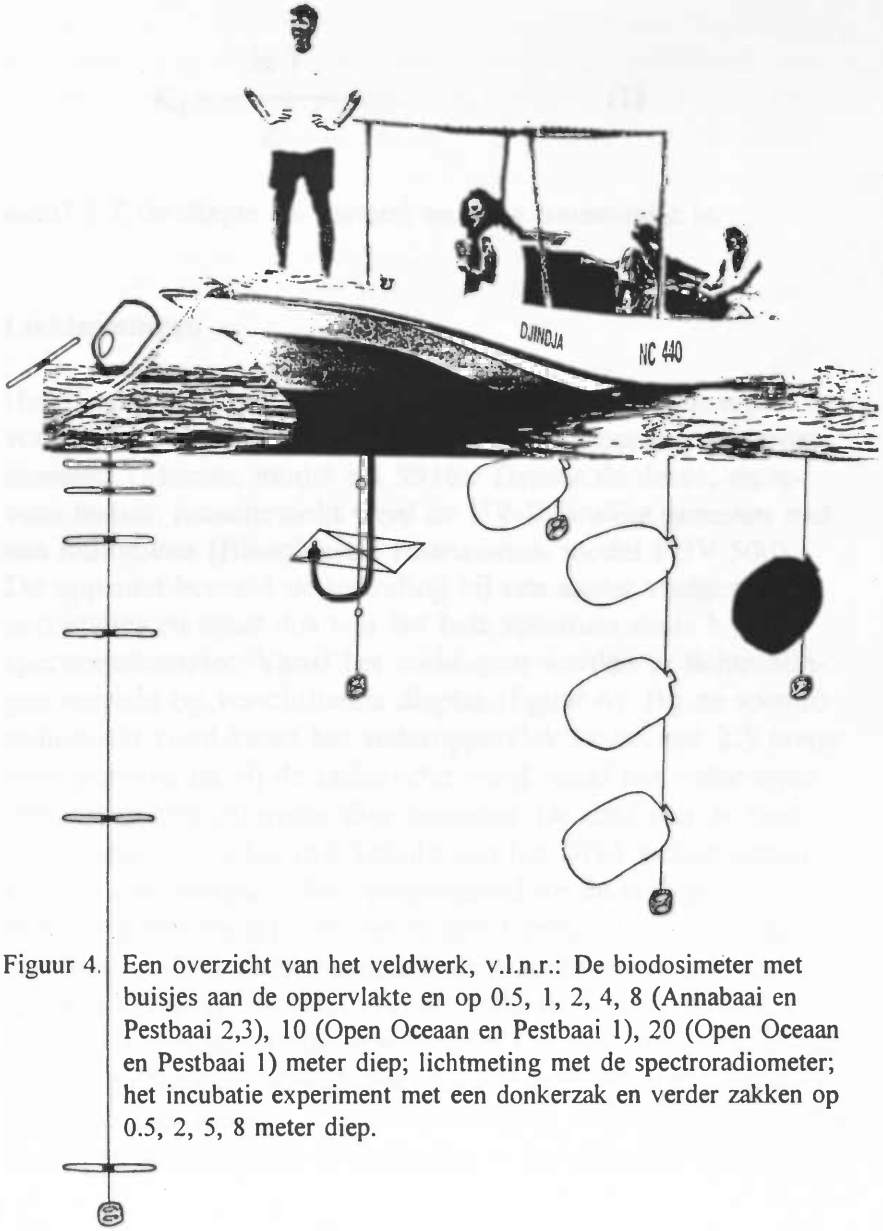
Figuur 3. Een overzicht van Curaçao met de monsterpunten Annabaai, Pestbaai en Open Oceaan.

Ieder monsterpunt werd drie keer één dag gemonsterd. Monsterpunt Open Oceaan lag honderden meters uit de kust, onder invloed van de westwaartse stroming rond het eiland. In de Pestbaai en Open Oceaan was het water helder. In de Pestbaai werd boven het rif gemonsterd, terwijl in de Open Oceaan diep kon worden gemonsterd. De verwachting was dat boven het koraalrif de invloed van de mixing groter zou zijn dan in de Open Oceaan, omdat in de Open Oceaan geen invloed van

de bodem is. Verder was het mogelijk dat het zonlicht in ondiep helder water door de bodem teruggekaatst kon worden. Annabaai werd als monsterpunt gekozen omdat dit een ondiep monsterpunt was met troebel water. Het was waarschijnlijk dat op dit monsterpunt de intensiteit van UV-B straling in de waterkolom snel zou afnemen waardoor de kans op DNA schade in organismen klein zou zijn. Annabaai was daardoor het controle punt voor deze studie naar de invloed van UV-B straling in helder tropisch oceaan water. De waarnemingen helder en troebel water kwamen overeen met de trofiëering uit een eerder onderzoek. Volgens Kloff en Steinhoff (1994) was het water in de Pestbaai en Open Oceaan oligotroof, terwijl het water in de Annabaai eutroof was. Het voedselrijke water wat uit de Annabaai stroomt werd snel verdunt doordat de waterstroom langs de kust vrij hoog was. De kans dat de monsterpunten Open Oceaan en Pestbaai door het Annabaaiwater zouden worden benvloed was dan ook erg klein (Kloff en Steinhoff, 1994). Tijdens de negen monsterdagen (tabel 1) werd er over de gehele dag gemonsterd vanaf een ± 7 meter lange Wahler en over de dag werden verschillende metingen uitgevoerd (figuur 4).

Tabel 1. Overzicht van de monsterdata voor de verschillende monstertochten op drie monsterpunten.

Monsterpunt	Monstertocht 1	Monstertocht 2	Monstertocht 3
Annabaai	14-11-1996	21-11-1996	09-12-1996
Pestbaai	07-11-1996	25-11-1996	05-12-1996
Open Oceaan	11-11-1996	19-11-1996	03-12-1996



Figuur 4. Een overzicht van het veldwerk, v.l.n.r.: De biodosimeter met buisjes aan de oppervlakte en op 0.5, 1, 2, 4, 8 (Annabaai en Pestbaai 2,3), 10 (Open Oceaan en Pestbaai 1), 20 (Open Oceaan en Pestbaai 1) meter diep; lichtmeting met de spectroradiometer; het incubatie experiment met een donkerzak en verder zakken op 0.5, 2, 5, 8 meter diep.

Biodosimeter

Het doel van de biodosimeter was te meten hoe diep de biologische effectieve UV-B straling doordringt in de waterkolom. De biodosimeter bestond uit quartzbuisjes die een inhoud van circa 1.5 ml hadden. Deze buisjes waren geheel gevuld met een oplossing met kaal DNA afkomstig uit kalfsthymus (protocol biodosimeter). Quartzbuisjes werden gebruikt omdat quartz nauwelijks UV-straling absorbeert. Om reparatie van het door UV-straling beschadigde DNA te voorkomen werd er gebruik gemaakt van kaal DNA. De mate van beschadiging van het kaal DNA is een maat voor de biologische effectieve UV-dosis op een bepaalde diepte.
Op elke diepte hingen twee quartzbuisjes, die met een stukje plastic slang met elkaar waren verbonden. Deze buisjes werden aan een touw bevestigd en met behulp van een subsurfaceflow en een contragewicht opgehangen. De biodosimeter hing de hele monsterdag van ± 9.00 - 18.00 overboord, met uitzondering van monstertocht 3, waarbij de biodosimeter evenlang in het water hing als de incubatie experimenten. Op de ondiepe monsterpunten, Annabaai en Pestbaai, werd tot en met 8 meter gemeten en op het diepe monsterpunt, Open Oceaan, werd tot en met 20 meter diepte gemeten. Een uitzondering was de eerste biodosimetermeting van de Pestbaai. Hier werd tot 20 meter gemeten door duikend de biodosimeter op de drop-off zone van het rif te bevestigen.
Met de uiteindelijke resultaten is per monsterpunt de uitdovingscoëfficiënt, K_d, te berekenen. Deze wordt berekend volgens de formule:

$$K_d = \frac{-\ln T}{Z} \qquad (1)$$

waarbij Z de diepte (in meters) en T de transmissie is.

Lichtmetingen

Hoe diep UV-B straling doordringt in de waterkolom werd voor de eerste twee monstertochten bepaald met een spectroradiometer (Macam, model SR 9910). Tijdens de derde, en tevens laatste, monstertocht werd de UV-B straling gemeten met een radiometer (Biospherical Instruments, model PUV 500). Dit apparaat bepaald de instraling bij een aantal vastgestelde golflengtes en scant dus niet het hele spectrum zoals bij de spectroradiometer. Vanaf het middaguur werden er lichtmetingen verricht op verschillende dieptes (figuur 4). Bij de spectroradiometer werd vanaf het wateroppervlak tot en met 2.5 meter diep gemeten en bij de radiometer werd vanaf het wateroppervlak tot en met 20 meter diep gemeten. De data van de spectroradiometer werden met behulp van het DNA actiespectrum van Setlow (Setlow, 1974) omgerekend tot de biologische effectieve instraling en vervolgens met formule 1 de uidovingscoëfficiënt, K_d Setlow, berekend. De transmissie werd hierbij berekend door de instraling op een bepaalde diepte te delen door de instraling aan de oppervlakte. De uitdovingscoëfficiënt bij een golflengte van 305 nm (K_d 305 nm) werd nog apart berekend met formule 1. Deze berekening werd gemaakt omdat de laatste monstertocht de instraling is gemeten met een radio-

meter, die de UV-B straling alleen op 305 nm meette. De resultaten van de lichtmetingen kan vergeleken worden met de resultaten van de biodosimeter. Met de biodosimeter werd over de gehele dag de werkelijke biologisch effectieve dosis gemeten, terwijl met de spectroradiometer en de radiometer alleen de biologische effectieve instraling op een bepaalde tijd werd gemeten.
Met behulp van de uitdovingscoëfficiënten kan per monsterpunt de 1% diepte van de UV-B straling worden berekend. Dit gebeurd aan de hand van een lineaire fit door de gemeten DNA schade (biodosimeter) of instraling (spectroradiometer of radiometer op 350 nm) op de verschillende dieptes. Met de formule $y = ax + b$ (waarbij a de K_d is en b de instraling aan het wateroppervlak) kan de diepte waar de gemeten DNA schade of de gemeten instraling van het oppervlak 1 % is, worden bepaald.

Veldmonsters

De gehele dag werden er (tijdens monstertocht 1 en 2) veldmonsters verzameld voor de
bepaling van DNA schade in het pico(fyto)plankton. Op deze manier kon de stand van zaken in de waterkolom worden bekeken. Er werden monsters genomen aan het begin van de dag, kort na het maximum van instraling van de dag (bepaald aan de hand van een landmeting met de spectroradiometer) en aan het einde van de dag. Met een colavaatje werd het oppervlaktewater bemonsterd. De monsters van 2, 5, 8 en 15 meter werden genomen met een Niskin bottle, waarbij het 15 meter monster alleen werd genomen in de Open Oceaan. Tijdens de eerste monstering in de Pestbaai werd er wel met een plastic zak duikend een 15 meter monster genomen. Het water werd in colavaatjes gegoten en onder druk van 1.5 bar gefiltreerd over 10 µm, 1 µm en 0.2 µm polycarbonaatfilters (∅ 47 mm, Poretics® Products, zie protocol filtreren in bijlage). De filtratieopstelling kon twee watermonsters tegelijkertijd filtreren, deze filtratie duurde een uur. Na het eerste half uur werd het filter met de kleinste poriegrootte afgekoppeld. Tijdens monstertocht 2 werd er in plaats van de bovengenoemde filters gefiltreerd over 10 µm polycarbonaatfilter (∅ 47 mm, Poretics® Products) en glasfiber, GF/F, filter (∅ 47 mm, Whatman). Aan het einde van de filtraties werden de filterhouders drooggeblazen en de filters (0.2 µm, 1 µm of GF/F) werden opgevouwen en verpakt in aluminiumfolie. Deze filters werden direkt ingevroren in een dewar met vloeibare stikstof. De veldmonsters werden op deze manier in 1 of 2 verschillende fracties verzameld; < 10 µm bij GF/F filters tijdens monstertocht 2 en bij monstertocht 1, 1 µm ≤ 1 µm fractie < 10 µm en 0.2 µm ≤ 0.2 µm fractie < 1 µm. Tijdens de filtratie werden er watermonsters genomen van de fracties < 10 µm (1e en 2e monstertocht) en < 1 µm (1e monstertocht). Van elk watermonster werd 2 ml in een eppendorf cupje gepipeteerd en gefixeerd met 25 µl formaldehyde (37 % gebufferd met dinatrium tetraboraat tot pH 7.8). Na een half uur werden de watermonsters ingevroren in een dewar met vloeibare stikstof. Deze monsters zouden later in het laboratorium kunnen worden bestudeert met de flowcytometer (dit is niet tijdens dit onderzoek gedaan). Met behulp van deze techniek kan een indicatie van de soortensamenstelling worden verkregen.

Maat voor yellow substance

Naast de bepaling van DNA schade en de soortensamenstelling werd per monsterpunt de pigmentsamenstelling en de yellow substance in het water bepaald. Dit gebeurde door middel van 10 liter oppervlaktewater te filtreren over alleen een GF/F filter (∅ 47 mm, Whatson, protocol filtratie, zie bijlage). Tijdens de filtratie werd 50 ml filtraat opgevangen in een blauwe dopbuis, die daarna koel werd bewaard. Het filter werd na de monstering direkt ingevroren in een dewar met vloeibare stikstof. In het laboratorium zou met behulp van de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) de pigmentsamenstelling op de GF/F filter kunnen worden bepaald (dit is niet gedaan tijdens dit onderzoek). Het filtraat werd tot aan de yellow substance bepaling koel gehouden in de koelkast (in het veld in een koelbox met koelelementen). Met de spectrofotometer (CARY doublebeam, model 3E UV/VIS) werd de absorbtie van ieder watermonster bij verschillende golflengtes bepaald. De absorbtie bij een golflengte van 380 nm een maat voor de yellow substance concentratie.

Incubatie experimenten

Vanaf de eerste Annabaai monstering (14-11-1996) werden in samenwerking met Petra Visser (NIOZ, Texel) incubatie experimenten uitgevoerd. In dit experiment werd de situatie in vergelijking tot het veld veranderd. Met de zakken werd mixing uitgesloten en voor elke zak (en de ochtendmeting) werd oppervlaktewater gebruikt wat s'ochtends tegelijk werd verzameld. Met dit incubatie experiment zou de verandering in DNA schade over de dag en op verschillende dieptes kunnen worden bepaald.

Petra Visser heeft bij elk monsterpunt over de gehele dag de bacteriële produktie in de zakken gemeten. Dit is gedaan met behulp van gelabeld leucine (^{14}C leucine), wat direkt in het eiwit wordt opgenomen (Simon en Azan, 1989; Kirchman, 1993 (1)).

s'Ochtends vroeg werden vijf UV-doorlatende zakken gevuld met oppervlaktewater van dat monsterpunt. Tegelijkertijd werd er een colavaatje met oppervlaktewater gevuld en direkt gefiltreerd. Deze monstering was om de DNA schade aan het begin van de dag te kunnen bepalen. Vier zakken werden op een diepte van 0.5, 2, 5 en 8 meter in het zonlicht gehangen. De overblijvende zak werd in een vuilniszak in het donker gehouden en in het water gehangen. De donkerzak werd gezien als controlezak van dit experiment, omdat in deze zak geen toename in DNA schade kan zijn. Eventuele donkerreparatie kan een afname in DNA schade ten opzichte van de ochtendmonstering veroorzaken. Op het eind van de dag werden alle watermonsters uit de 5 incubatie zakken leeggegoten in colavaatjes en direkt gefiltreerd. De ochtendmonstering en de watermonsters uit de zakken werden allemaal op dezelfde manier als hiervoor beschreven gefiltreerd over 10 µm, 1 µm en 0.2 µm filters. De filters (0.2 µm, 1 µm) en de watermonsters, gefixeerd met formaldehyde, werden ingevroren in een dewar met vloeibare stikstof.

Terug op Carmabi werden alle koelboxmonsters in de koelkast bewaard en alle monsters uit de dewar werden tussen droog-ijs in de -20 °C vriezer gelegd.

Bepaling van DNA schade

Op het microalgen-laboratorium van Mariene Biologie, Rijks *universiteit* Groningen, werden alle monsters (biodosismeter, veldmonsters en incubatie experimenten) voor de bepaling van de DNA schade verder geanalyseerd (januari t/m april 1997).

DNA isolatie

Om de DNA opbrengst zo hoog mogelijk te laten worden, werden er twee DNA isolatiemethodes uitgeprobeerd. Het verschil tussen beide methodes was een verschil in extractiebuffer. De extractiebuffer sodium-dodecyl-sulfaat, SDS, is een agressief middel wat de gehele cel kapot maakt. Cetyl-trimethyl-ammonium-bromide, CTAB, is een stuk minder agressieve extractiebuffer wat alleen een gaatje in de celwand maakt waardoor het DNA uit de cel kan worden gehaald. De verwachting was dat SDS meer DNA zou opleveren, want bij een isolatie met CTAB is het niet zeker of al het DNA uit de cel wordt gehaald. Voor de beide DNA isolaties werden de protocollen, DNA-isolatie SDS (zie bijlage) en DNA-isolatie CTAB (zie bijlage) gevolgd. De filters van watermonsters van twee testexperimenten werden gebruikt. Per extractiebuffer werden filters van beide filtratieopstellingen gebruikt om de eventuele invloed hiervan uit te schakelen. Na de DNA isolatie werd het DNA gekwantificeerd zoals wordt beschreven in de paragraaf DNA kwantificatie.
Uit tabel 2 blijkt dat de DNA isolatie met CTAB als extractiebuffer veel meer DNA opleverde dan de DNA isolatie met SDS als extractiebuffer. Voor de verdere uitwerking van de veldmonsters werd voor DNA isolatie het protocol DNA-isolatie CTAB gevolgd. Dit protocol is bestemd voor de isolatie van DNA uit 1 µm en 0.2 µm polycarbonaatfilters. De GF/F filters werden behandeld zoals in protocol DNA-isolatie CTAB voor GF/F filters wordt beschreven.

Tabel 2. De resultaten van DNA isolatie met SDS en CTAB als extractie buffer.

Vergelijking van methode van DNA isolatie, met CTAB en SDS			
monster + vat	**filter**	**isolatie methode**	**DNA totaal geisoleerd (ng)**
test 1 vat A	0.2 um	CTAB	140
test 1 vat A	1 um	CTAB	2283
test 2 vat B	0.2 um	CTAB	2126
test 2 vat B	1 um	CTAB	3640
test 1 vat B	0.2 um	SDS	7
test 1 vat B	1 um	SDS	190
test 2 vat A	0.2 um	SDS	28
test 2 vat A	1 um	SDS	697

DNA kwantificatie

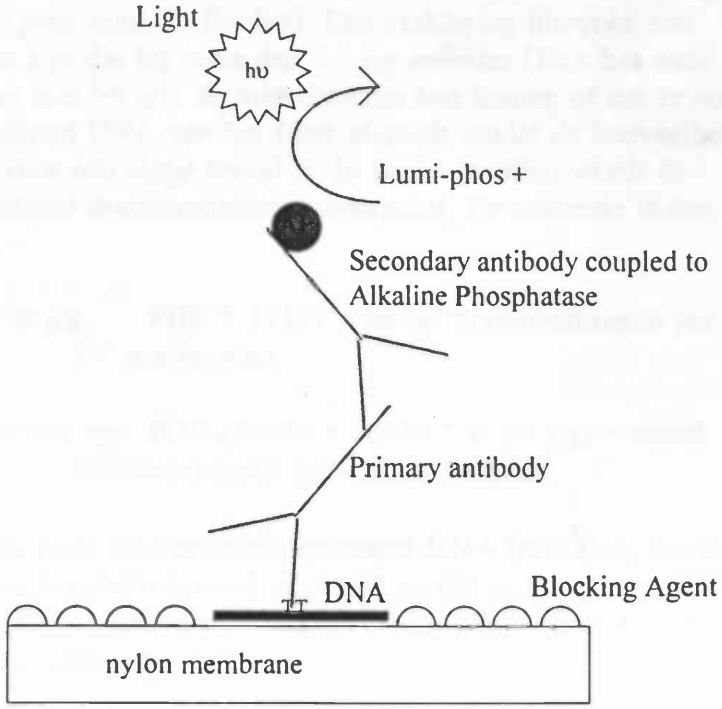
Het geisoleerde DNA is gekwantificeerd met behulp van PicoGreen® (Molecular probes) en fluorimeter (WALAC 1420 multilabel counter, zie bijlage protocol DNA analyse m.b.v. PicoGreen® en fluorimeter). PicoGreen® fluorisceerd als het is gebonden aan dubbelstrengs DNA.

DNA schade

Voor de analyse van de hoeveelheid thyminedimeren in het DNA van de monsters, werd gekozen voor de immunoslotblotmethode. Deze methode werd succesvol uitgetest op verschillende labcultures (Spoelstra, 1996), maar was nog niet eerder voor analyse van DNA schade in veldmonsters gebruikt. Het nadeel van deze methode is dat je voldoende DNA moet verzamelen. Voor de veldmonsters en incubatie experimenten hield dit in dat er grote watermonsters (aantal liters) nodig waren om genoeg DNA te isoleren.

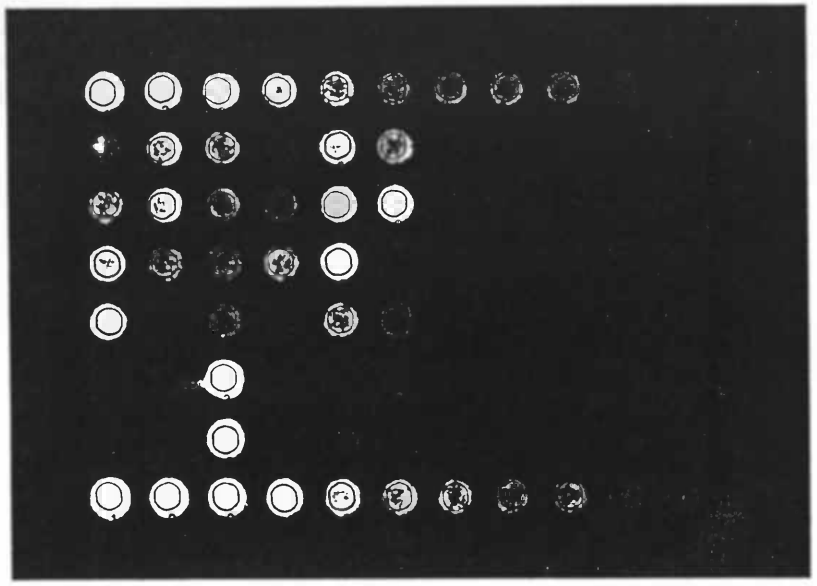
Het protocol immunoslotblot (zie bijlage) werd gevolgd, hierbij werd gebruik gemaakt van het blotapparaat van Schleicher en Schüll (SRC 96 D Minifold I). Op een nylon filter (Schleicher en Schüll, Nytran® 0.45 neutrale nylontransfermembraan) werd het DNA opgebracht, waarbij de hoeveelheid afhankelijk was van de hoeveelheid geisoleerd DNA. Wanneer er meer DNA was geisoleerd werd er ook meer opgebracht om de kans op het meten van schade te vergroten. De hoeveelheid opgebracht DNA werd wel per filtergrootte gelijkgehouden. Voor deze behandeling werd gekozen omdat er nog geen voorgaande studies met veldmonsters waren gedaan en het dus onbekend was hoeveel DNA nodig was voor een analyse van DNA schade. Het kaal DNA uit de quartzbuisjes van de biodosismeter (concentratie 11 µl/ml) werd 100 x verdund en daarvan werd 100 µl op het nylon filter gebracht.

Naast het DNA van de veldmonsters werd ook een ijklijn opgebracht. Deze ijklijn was gemaakt volgens het protocol 'PBB verdunningen', en kon vervolgens weer gecalibreerd worden met een ijklijn HH-DNA (protocol HH-DNA). Het DNA werd bij 80 °C op de nylon filter gebakken en om a-specifieke binding te voorkomen werd het filter daarna geblokt met melkpoeder. De blot werd geïncubeerd met het H3 antilichaam (L. Roza, TNO, Zeist), wat is gericht tegen thyminedimeren. Vervolgens werd een tweede antilichaam, AP mouse immunoglobulins DO 314 DAKO, gebonden aan het H3 antilichaam (figuur 5).



Figuur 5. Vereenvoudigd overzicht van de immunoslotblottechniek gebruikt bij de kwantificatie van thyminedimeren.

Aan het tweede antilichaam zit het enzym Alkaline fosfatase wat de reactie catalyseerd waarbij Lumi-Phos® plus (GibcoBRL.) wordt omgezet. Bij deze reaktie komt licht vrij en op een lichtgevoelige film die voor enige tijd op het blot wordt gelegd (en zo dus wordt belicht), wordt het uiteindelijke resultaat van de techniek zichtbaar.



Figuur 6. De negatieve afbeelding (scan) van de film, het uiteindelijke resultaat van de immunoslotblottechniek.

De film werd gescant in Photo Adobeshop en met de negatieve afbeelding van de film (figuur 6) werd de DNA schade gekwantificeerd zoals in het protocol immunoslotblot staat beschreven. De velddata werden gecalibreerd met een ijklijn van PBB. De schade in het monster DNA wordt berekend met behulp van PBB DNA wat een bekende hoeveelheid thyminedimeren bevat. Uit experimenten is gebleken dat voor een hoeveelheid opgebracht DNA, wat meer is dan 0.5 μg, moet worden gecorrigeerd zoals in de onderstaande formules is weergegeven (pers. com. P. Boelen). Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat bij meer dan 0.5 μg monster DNA het antilichaam niet bij alle thyminedimeren kan komen of dat er een hoeveelheid DNA van het filter afspoelt omdat de hoeveelheid DNA voor één slotje teveel is. In beide gevallen wordt de hoeveelheid thyminedimeren onderschat. De correctie is dan als volgt:

$Z \geq 0.5$ in μg; PBB * 33333 = aantal thyminedimeren per 10^6 nucleotiden

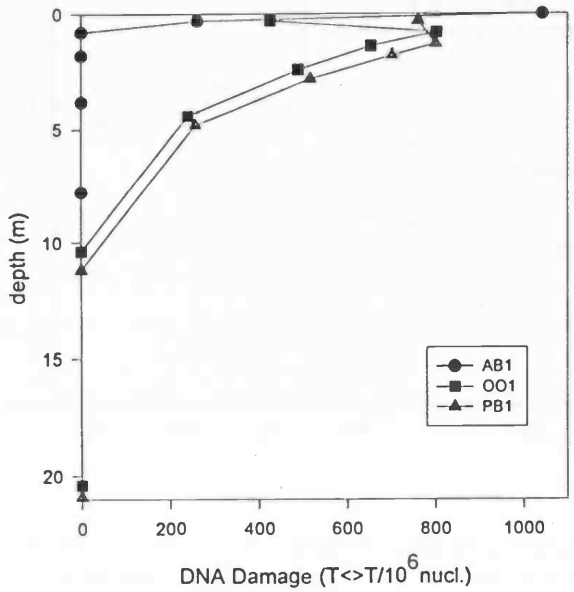
$0 < Z < 0.5$ in μg; PBB (20000 + 26666 * Z (in μg) = aantal thyminedimeren per 10^6 nucleotiden

Waarbij Z de hoeveelheid opgebracht DNA (in μg) op het blot is. Deze berekening werd toegepast omdat er voor de verschillende filters verschillende hoeveelheden DNA op de nylon filter zijn gebracht.

RESULTATEN

Biodosimeter

Alleen de biodosimeter van monstertocht 1 werd geanalyseerd (figuur 7). Hieruit blijkt dat in de Annabaai al vrij snel geen DNA schade meer te vinden was. Pestbaai en Open Oceaan zijn vergelijkbaar en hierin is na 10 meter geen DNA schade meer zichtbaar. Uit deze biodosimeter resultaten konden de uitdovingscoefficiënten worden berekend (tabel 3).



Figuur 7. De DNA schade (thyminedimeren per 10^6 nucleotiden) van de biodosimeter van de verschillende monsterpunten uitgezet tegen de diepte.

Tabel 3. De uitdovingscoeffiënt, K_d (m^{-1}), en de 1 % diepte (m) van de verschillende monsterpunten, waarbij K_d BDS de uitdovingscoëfficiënt is berekend uit de biodosimetermetingen, K_d Setlow de uitdovingscoëfficiënt is berekend uit de lichtmetingen van de spectroradiometer en K_d 305 nm de uitdovingscoëfficiënt is berekend uit de lichtmetingen van de radiometer.

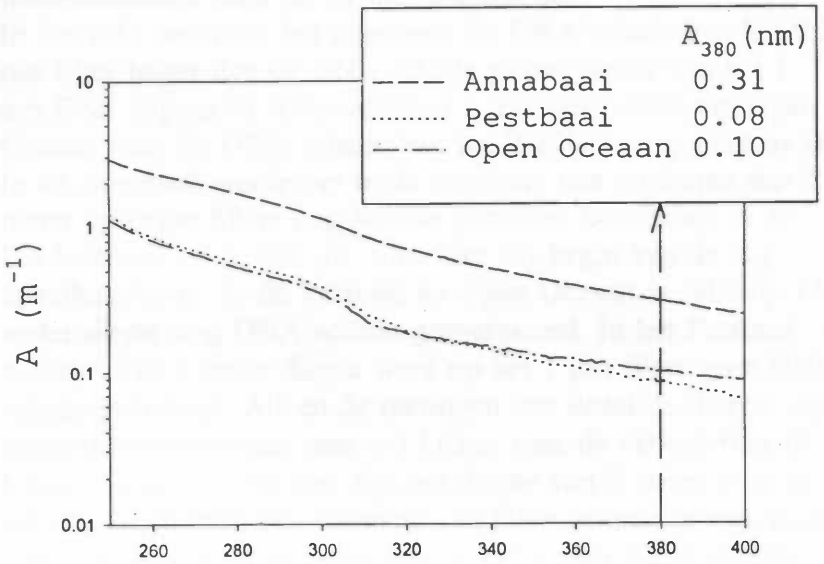
monsterpunt	datum	Kd BDS (1% diepte)	Kd Setlow (1% diepte)	Kd 305 nm (1% diepte
Annabaai	14 nov '96	4.69 (1)	1.62 (3)	
Annabaai	21 nov '96			
Annabaai	9 dec '96			*2.55 (2)
Pestbaai	7 nov '96	0.33 (14)	0.35 (13)	0.36 (13)
Pestbaai	25 nov '96		0.37 (12)	0.36 (13)
Pestbaai	5 dec '96			*0.38 (12)
Open Oceaan	11 dec '96	0.33 (14)	0.57 (8)	0.64 (7)
Open Oceaan	19 dec '96		0.29 (16)	0.36 (13)
Open Oceaan	3 dec '96			*0.28 (16)

* Kd 305 nm gemeten met PUV

De oppervlaktepunten van Pestbaai en Open Oceaan zijn bij deze berekeningen weggelaten. Waarschijnlijk hebben de quartzbuisjes te veel in de schaduw van de subsurfaceflow gehangen. De uitdovingscoëficiënt van de Annabaai is minder nauwkeurig doordat deze uit twee meetpunten is berekend. De uitdovingscoëfficiënten berekend uit de lichtmetingen komen redelijk overeen met de biodosimeterresultaten, waarbij vanuit wordt gegaan dat de biodosismeter metingen nauwkeuriger zijn (zie materiaal en methode). Hetzelfde geldt voor de 1% diepte.

Maat voor yellow substance

De resultaten van de yellow substance bepaling (figuur 8) laten zien dat er in de Annabaai een veel hogere concentratie organisch materiaal werd gevonden.



Figuur 8. de absorbtie A (m^{-1}) uitgezet tegen de golflengte (nm), de absorbtie bij een golflengte van 380 nm is de maat voor de yellow substance concentratie van de verschillende monsterpunten.

Windsnelheden tijdens de monsterdagen

Tabel 4 laat zien wat de windsnelheden en richtingen waren ten tijde van de monsterdagen.

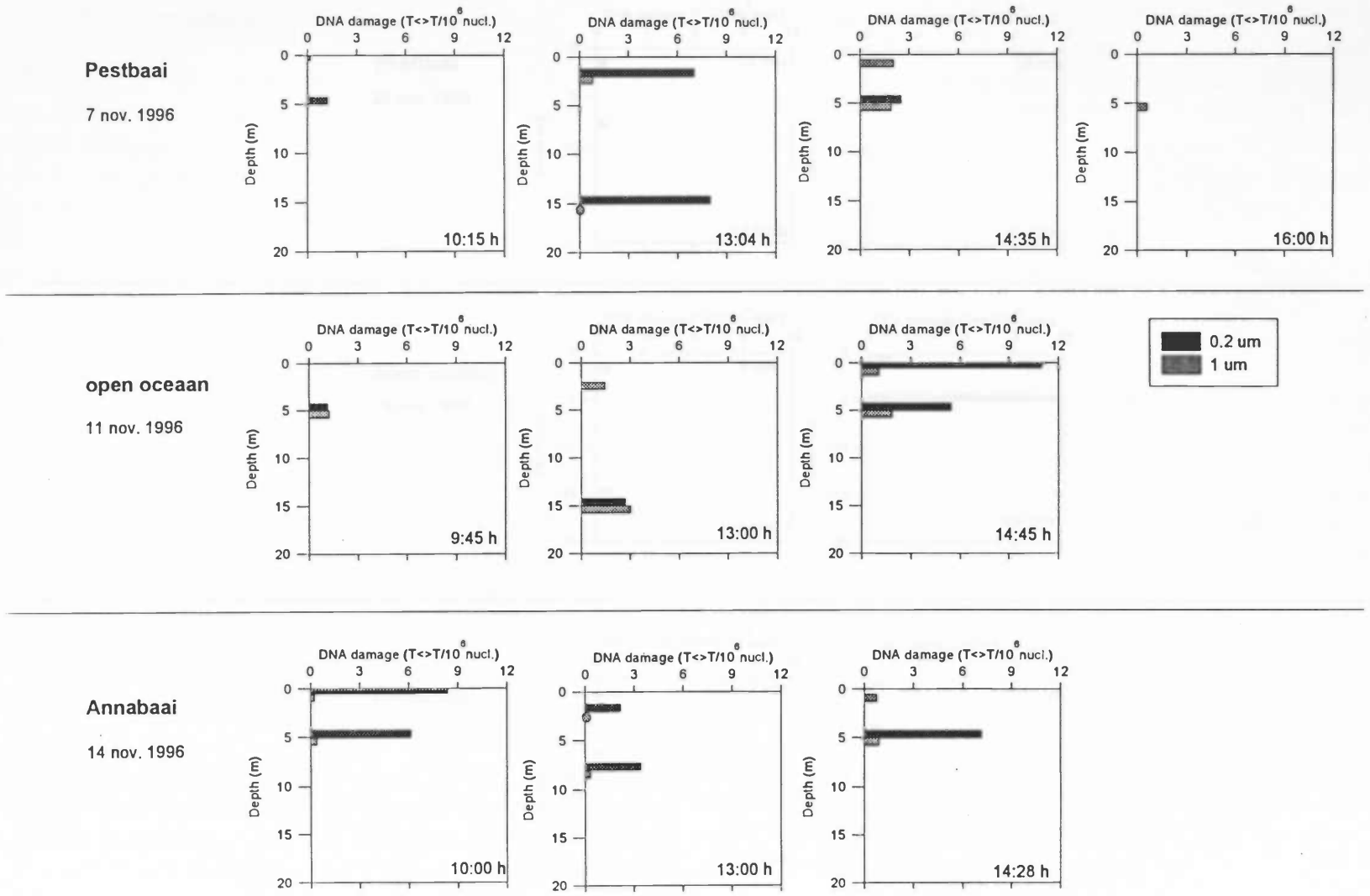
Tabel 4. De windrichtingen en de gemiddelde windsnelheden (m/s) gemeten op vliegveld Hato, Curaçao, op de dagen van het veldwerk (Meteorologische Dienst, Nederlandse Antillen).

Monsterpunt	Datum	Windsnelheid	Windrichting
		(m/s)	
Pestbaai 1	07-11-1996	6.6	NO - O
Open Oceaan 1	11-11-1996	5.8	NOO - O
Annabaai 1	14-11-1996	6.2	O
Open Oceaan 2	19-11-1996	2.3	N - ZO
Annabaai 2	21-11-1996	2.3	NNO - Z
Pestbaai 2	25-11-1996	6.8	NOO - O
Open Oceaan 3	03-12-1996	7.7	NO - NOO
Pestbaai 3	05-12-1996	7.2	NO - NOO
Annabaai 3	09-12-1996	7.1	NOO

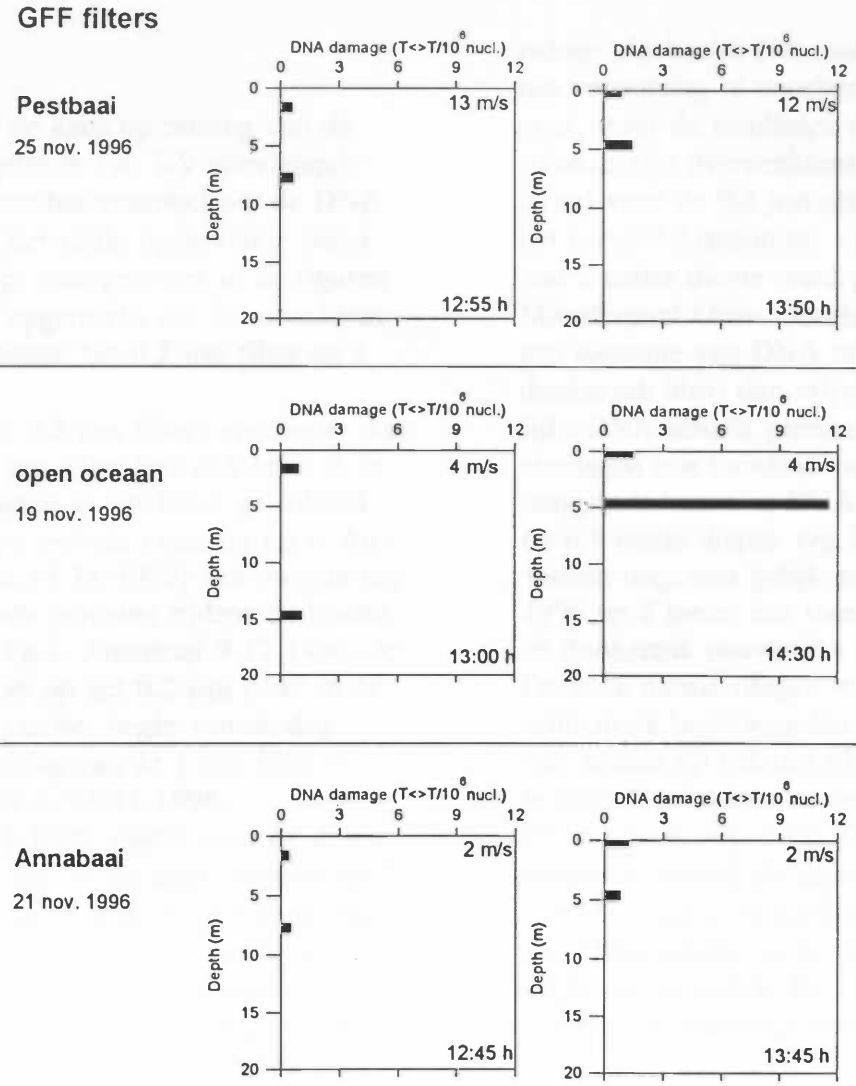
Over het algemeen had de wind een snelheid tussen de 6 en 7 m/s en kwam hoofdzakelijk uit noordoostelijke richting (=landafwaards aan de zuidelijke kant van het eiland, zie figuur 3). Behalve 19-11 en 21-11, toen was er als gevolg van een tropische storm in het Caribisch gebied bijna geen wind (2 m/s) in de omgeving van Curaçao.

Veldmonsters

De DNA opbrengst van de 0.2 µm filter was een stuk lager dan de DNA opbrengst van 1 µm filter en de GF/F filter (tabel A, zie bijlage). Bovendien was het aantal gefiltreerde liters per uur per monsterpunt verschillend. De filtratiesnelheid in de Annabaai was ongeveer 1 liter per uur. Open Oceaan had een filtratiesnelheid > 10 liter per uur, terwijl in de Pestbaai de filtratiesnelheid rond de 10 liter per uur lag.
In het veld was over het algemeen de DNA schade van het 0.2 µm filter hoger dan de DNA schade geanalyseerd van het 1 µm filter (figuur 9). Uitgezonderd 2 monsterpunten van Open Oceaan waar de DNA schade van beide filters vergelijkbaar is. In de Annabaai werden er in de monsters van en dieper dan 5 meter op beide filters nog schade gemeten. Bovendien is de DNA schade op de 0.2 µm filter aan het begin van de dag opvallend hoog. In de Pestbaai en Open Oceaan is zelfs op 14 meter diepte nog DNA schade geanalyseerd. In het Pestbaai monster van 2 meter diepte werd op het 1 µm filter geen DNA schade gevonden. Alleen de metingen van dezelfde dieptes zijn vergelijkbaar wanneer men wil kijken naar de verandering in DNA schade over de dag. Op een diepte van 5 meter is er in alle monsterpunten een toename van DNA schade te zien in de loop van de dag. Deze waarneming geldt voor beide grootte fracties. Voor 1 µm filter Pestbaai is geen ochtenmeting maar een avondmeting waarin de DNA schade aan het afnemen is.
Voor monstertocht 2 zijn alle veldmonsters gefiltreerd over een GF/F filter (figuur 10).
De hoeveelheid van de DNA schade op het GF/F filter is vergelijkbaar met de hoeveelheid DNA schade op het 1 µm filter, uitgezonderd de monstering welk was verzameld op 5 meter diepte in de Open Oceaan op 14.30 h. Opvallend is het verschil in windsnelheden tussen de monsterdata. Het is niet mogelijk om de veranderingen in DNA schade over de dag tussen de monsterpunten te vergelijken, omdat de monsteringen onder verschillende omstandigheden zijn genomen. Van beide figuren (9 en 10) is een vergelijking tussen de monsterpunten niet ook mogelijk.



Figuur 9. De DNA schade (thyminedimeren per 10^6 nucleotiden) van de veldmonsters van de 0.2 μm en de 1 μm filter uitgezet tegen de diepte (m) en onderverdeeld per monsterpunt en tijdstip.

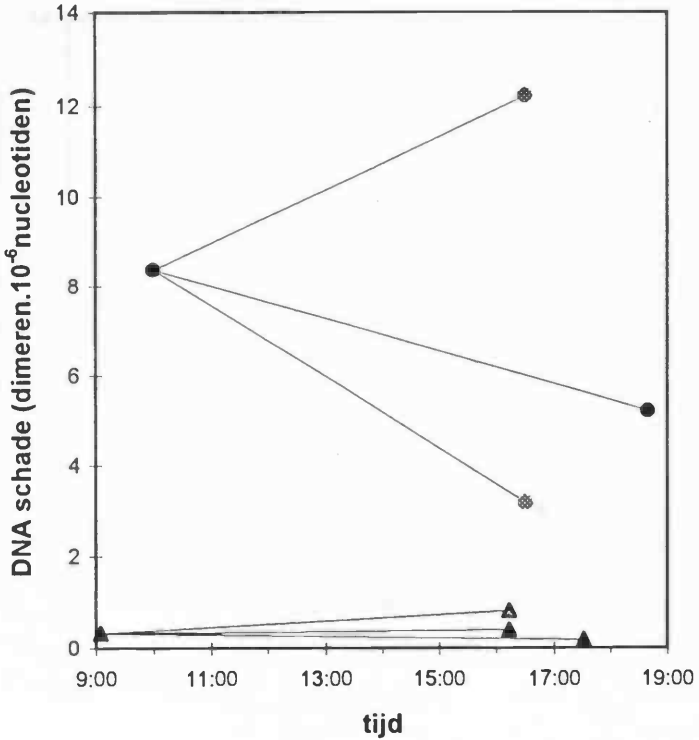


Figuur 10. De DNA schade (thyminedimeren per 10^6 nucleotiden) van de veldmonsters van de GF/F filters uitgezet tegen de diepte (m) en onderverdeeld per monsterpunt en tijdstip

Incubatie experimenten

In het incubatie experiment werd de kans op mixing van de waterlagen uitgesloten door het gebruik van UV doorlatende zakken. Deze zakken hadden tevens het voordeel om de DNA schade over de dag te meten met hetzelfde oppervlakte water als uitgangspunt. De resultaten zijn weergegeven in de figuren 11, 12, 13, waarbij moet worden opgemerkt dat de schaal van de y-as (DNA schade) verschilt tussen het 0.2 µm filter en 1 µm filter.
De maximale DNA schade van de 0.2 µm filters zijn hoger dan de maximale DNA schade van 1 µm filter (zie ook tabel A in de bijlage). De DNA schade gemeten in het DNA geisoleerd van het 0.2 µm filter van de eerste periode (waarbij i.p.v. Annabaai 21-11-1996, de meting van 14-11-1996) van monstering was veel hoger dan de DNA schade gemeten tijdens de laatste periode van monstering (waarbij i.p.v. Annabaai 9-12-1996, de meting 21-11-1996). Verder was er op het 0.2 µm filter in de eerste periode veel DNA schade aan het begin van de dag. DNA schade op het begin van de dag van de 1 µm filter is alleen merkbaar hoger bij Pestbaai 2, 25-11-1996.
In de Annabaai (figuur 11), 14-11-1996, neemt over de dag de DNA schade op 0.5 meter diepte toe. In de donkerzak en op 2 meter diepte neemt de DNA schade af in de loop van de dag. De resultaten van 0.2 µm filter van 21-11-1996 Annabaai laten weinig DNA schade zien. Dit in tegenstelling tot het 1 µm filter die voor beide dagen een vergelijkbaar resultaat hebben. Ook hier is op beide dagen op 0.5 meter diepte over de dag een toename in DNA schade te zien. Omdat het verschil tussen monstertocht 2 en 3 in de Annabaai minimaal is (er lag beide dagen olie op het water), is alleen monstertocht 2 van de Annabaai afgebeeld. Het monsterpunt Annabaai 3 (9-12-1996) is om verwarring te voorkomen dus niet weergegeven in het figuur, maar de resultaten staan in tabel A (zie bijlage). De resultaten zijn overeenkomstig met de resultaten van 21-11-1996 zowel voor de 0.2 µm als 1 µm filter. Op de 0.2 µm filter van het oppervlaktemonster van het begin van de dag en de zak van 2 meter diepte werd geen DNA schade gemeten.
Monsterpunt Open Oceaan (figuur 12) laat voor 0.2 µm filter een toename van DNA schade over de dag zien op 8 meter. De donkerzak blijft dan vrijwel gelijk. Op 3-12-1996 werd nauwelijks DNA schade gemeten. Op de 1 µm filter is beide monsterdagen een toename van schade over de dag te zien. De hoogste toename in DNA schade is voor beide monsterdagen op 0.5 meter diepte. Op 19-11-1996 blijven de 2 en de 8 meter zakken ongeveer gelijk aan de donkerzak. Terwijl op 3-12-1996 op 2 meter een toename in DNA schade werd gemeten en de donkerzak nauwelijks toename in DNA schade had.
De twee monsterdagen in de Pestbaai hebben een groot verschil in de beginwaarden (figuur 13). Er is nauwelijks toename van schade op 0.2 µm filter van 25-11-1996 op 2 meter diepte te zien. De 5 meter en de donkerzak vertonen een afname in DNA schade. Op 5-12-1996 is er een afname te zien in de 2 meterzak, terwijl de andere monsteringen ongeveer gelijk blijven De 1 µm filterresultaten laat op 25-11-1996 een afname van DNA schade in de dieptezakken zien en de donkerzak blijft vrijwel gelijk. De DNA schade resultaten van 5-12-1996 verschillen onderling nauwelijks.

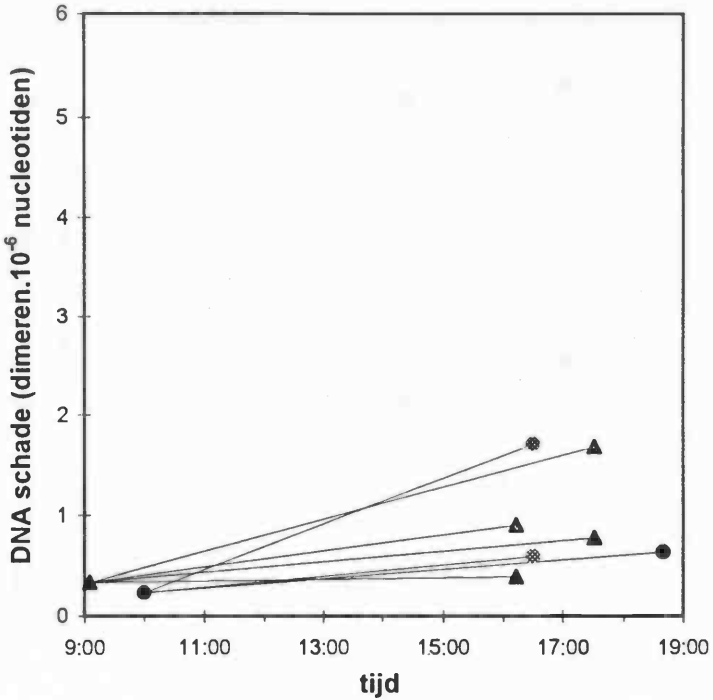
ANNABAAI 0.2 um filter



14-11-1996 — 0.5 meter — 2 meter — donker

21-11-1996 — 2 meter — 5 meter — donker

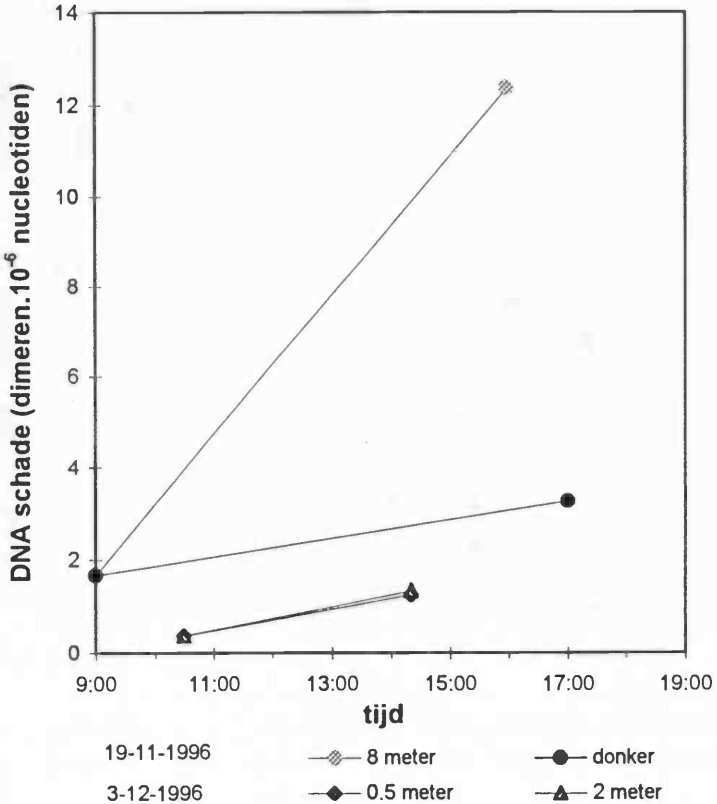
ANNABAAI 1 um filter



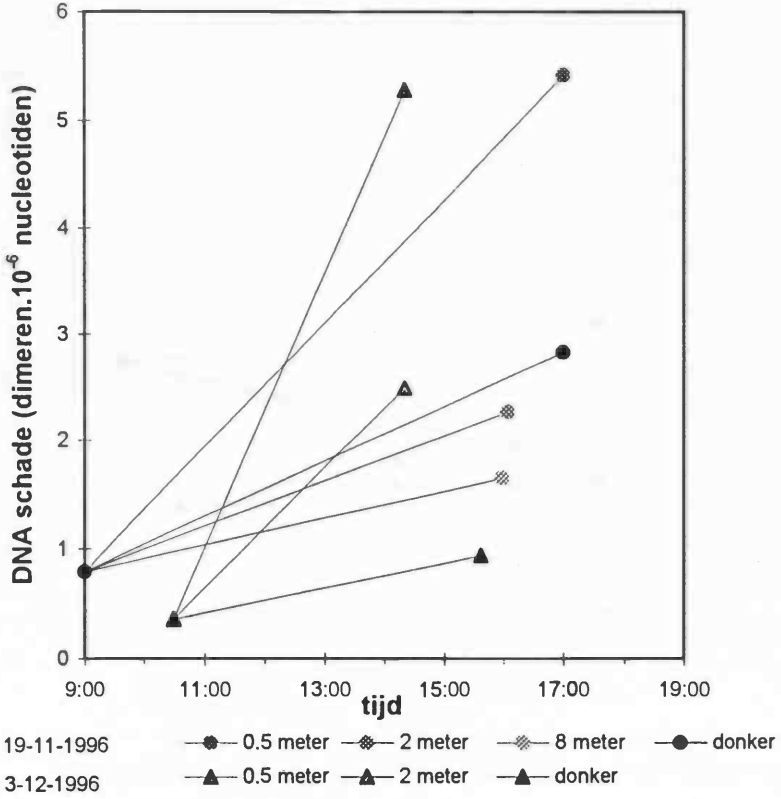
14-11-1996 — 0.5 meter — 2 meter — donker

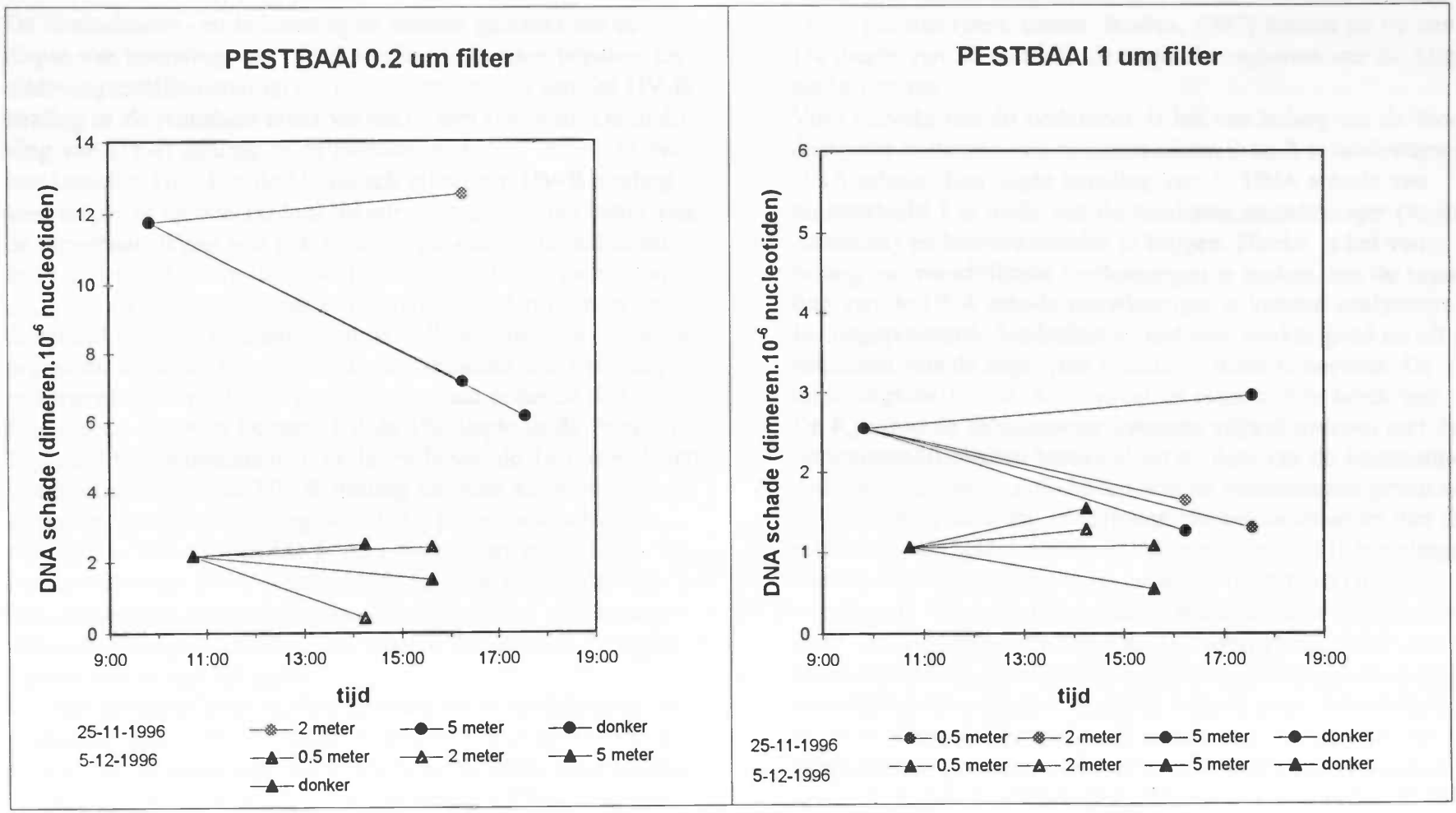
21-11-1996 — 0.5 meter — 2 meter — 5 meter — donker

OPEN OCEAAN 0.2 filter



OPEN OCEAAN 1 um filter





Figuren 13. Monsterpunt Pestbaai: DNA schade (thyminedimeren per 10^6 nucleotiden) gemeten over de dag van de 0.2 μm en de 1 μm filter.

CONCLUSIES EN DISCUSSIE

De biodosimeter- en lichtmetingen werden gebruikt om de diepte van instraling van UV-B straling te kunnen bepalen. De uitdovingscoëfficiënten en de 1 % dieptes geven aan dat UV-B straling in de Annabaai zoals verwacht snel uitdoofd. De uitdoving van UV-B straling in de Pestbaai en Open Oceaan is overeenkomstig. Hier kan de biologisch effectieve UV-B straling veel dieper in de waterkolom doordringen dan in het water van de Annabaai. Water wat rijk is aan organisch materiaal absorbeert efficient UV-straling (Scully en Lean, 1994; Laurion *et al.*, 1997). De bovengenoemde resultaten worden daarom ondersteund door de resultaten van de yellow substance (opgelost organisch materiaal) metingen. In de Annabaai werd een hogere concentratie opgelost organisch materiaal gemeten dan in de Pestbaai en de Open Oceaan. Uit de 1% diepte in de Pestbaai blijkt dat bodemorganismen die leven boven de 14 meter, leven in een omgeving waar UV-B straling constant aanwezig is. Reflectie van UV-B straling door het rif vind waarschijnlijk niet plaats. Was dit wel het geval geweest dan zou bij een overeenkomstige DNA schade (zoals in deze studie) de Pestbaai een hogere yellow substance concentratie of een hogere concentratie organisch materiaal moeten hebben dan de Open Oceaan, dit is niet het geval.

De hoeveelheden DNA schade gemeten in de biodosimeter is overeenkomstig met de resultaten van Jeffrey *et al.* (1996a & 1996b). In dit onderzoek werd met bijna dezelfde biodosimeter techniek gemeten in de Golf van Mexico. De DNA schade is wel aan de hand van thyminedimeren bepaald, maar op een andere manier geanalyseerd. De 1% dieptes over een transect in de Golf van Mexico variëeren van 10 tot 20 meter en zijn vergelijkbaar met de 1% diepte van Open Oceaan en Pestbaai. Resultaten van de biodosimetingen tijdens een tocht met de M/S Tydeman (pers. comm. Boelen, 1997) komen uit op een 1% diepte van 20 meter in de tropische regionen van de Atlantische Oceaan.

Voor vervolg van dit onderzoek is het van belang om de biodosimeter metingen van monstertochten 2 en 3 te analyseren op DNA schade. Een duplo bepaling van de DNA schade van monstertocht 1 is nodig om de resultaten nauwkeuriger (vooral Annabaai) en betrouwbaarder te krijgen. Hierbij is het van belang om verschillende verdunningen te maken, om de bepaling van de DNA schade nauwkeuriger te kunnen analyseren. De uitgeprobeerde biodosimeter techniek werkte goed en uit de resultaten was de dagelijkse effectieve dosis te bepalen. De uitdovingscoëfficiënt, K_d, was uit de resultaten te berekenen. De K_d's van de biodosimeter kwamen vrijwel overeen met de uitdovinscoëfficiënten berekend uit de data van de lichtmetingen. De uitdovingscoëfficiënten van de biodosimeter geven een indruk van de hele dag en zijn daarom betrouwbaarder dan de uitdovingscoëfficiënten van de lichtmetingen. De lichtmetingen werden verder alleen maar op bepaalde tijdstippen (rond het middaguur) uitgevoerd. Bovendien werd gewacht op het moment dat er geen bewolking was. Dit werd gedaan voor een constante meting op elke diepte met vergelijkbare omstandigheden. Tijdens de monsterdagen was vrijwel altijd bewolking in de lucht. Over de dag gezien is er met de lichtmetingen een overschatting gemaakt omdat er minder instraling is geweest dan gemeten en berekend. Vergelijking met een overzicht van Smith en Baker (1979) over de penetratie diepte van UV-B straling in de waterkolom bevestigt de bovengenoemde conclu-

sie over het type water per monsterpunt. De uitdovingscoëfficiënten van Open Oceaan en de Pestbaai komen overeen met helder oceaan water en dat de uitdovingscoëfficient van Annabaai komt overeen met produktief oceaanwater met een hoge concentratie opgelost organisch materiaal.
De opbrengst van het geïsoleerde DNA was voor de 0.2 µm filter minder dan voor de 1 µm filter. Dit kom hoofzakelijk door het verschil in filtratieduur. De 0.2 µm filter werd na een half uur afgekoppeld, terwijl 1 µm filter een filtratieduur van 1 uur had. Het verschil in snelheid van de filtratie ligt aan het 'dichtslibben' van één van de filters (10 µm, 1 µm of 0.2 µm filter). Uit de studie van Kloff en Steinhoff (1994) blijkt dat een verschuiving van soortensamenstelling het gevolg kan zijn van eutrofiering. In de eutrofe Annabaai werd in verhouding tot Pestbaai en Open Oceaan veel minder picofytoplankton aangetroffen. Hier werd veel meer plankton met grotere afmetingen gevonden. Het relatief lage aantal cyanobacteriën is in de Annabaai opvallend (Kloff en Steinhoff, 1994). Door het verhoogde nutriënten aanbod is een klein organisme niet langer in het voordeel door hun hoge oppervlakte/volume ratio. Het voorkomen van grotere organismen kan de oorzaak zijn van de langzame doorstroming van het Annabaaiwater. Tevens kan de vervuiling een rol hebben gespeeld, zeker tijdens monsterdag 2 en 3. Het Annabaai water was deze dagen sterk vervuild met olie, wat als een film op het water lag.
De hoeveelheid DNA schade van organismen op 1 µm en GF/F filter is vergelijkbaar. Waarschijnlijk zijn organismen > 1 µm in grotere hoeveelheden aanwezig behalve in de Open Oceaan, daar werd waarschijnlijk gemonsterd in een piek van organismen < 1µm.
Uit de veldmonsters blijkt dat onder invloed van UV-B straling de organismen van 0.2 µm filter meer schade in het DNA hebben dan de organismen op de 1 µm filter. Op alle monsterpunten werd voor beide grootte fracties een toename in DNA schade gevonden in de loop van de dag op 5 meter diepte. Dit is vreemd voor monsterpunt Annabaai omdat de 1% diepte hoger ligt. Naast de Annabaai werd ook in de Pestbaai en Open Oceaan DNA schade gemeten beneden 1% diepte. Dit komt waarschijnlijk door verticale mixing in de waterkolom. In ondieper wateren lijkt meer mixing te zijn. Uit onderzoek van Delgadillo-Hinojosa *et al.* (1997) blijkt dat verticale mixing in de Californische Golf optreed bij windsnelheden rond 10 m/s. Deze hoge windsnelheid is op Curaçao niet voorgekomen. Maar mixing is niet alleen een resultaat van wind maar ook van onder andere stroming en diepte. Verder is het naast mixing mogelijk dat de organismen met DNA schade migreren naar dieptes waar geen UV-B straling is. Jeffrey *et al.* (1996a & 1996b) vindt dat de diepteprofielen van de bacterioplankton fractie (< 0.8 µm) afhankelijk van de oppervlakte mixing lijken te zijn. Bij kalme zee werd een diepteprofiel gevonden met de hoogste DNA schade aan het oppervlak en de DNA schade nam af tot 10 meter diep. In deze studie werd de DNA schade aan de hand van thyminedimeren bepaald. Alleen de analyse verschilt met deze studie. Jeffrey vindt veel meer DNA schade in de veldmonsters. Dit verschil kan zijn veroorzaakt door het verschil in locatie, meetopstelling, analyse methode, weer en het watertype.
In deze studie verschillen de monstertochten van elkaar. Dit hoeft niet alleen te liggen aan het verschil in locatie maar ook het weer en het weer van de voorgaande dagen kan van invloed zijn geweest. De ophoping van DNA schade aan het begin van een dag kan de oorzaak zijn van zonnige voorgaande

dagen. Indicatie van soortensamenstelling zou het verschil in monsterpunten en tussen de verschillende groottefracties kunnen verklaren. Dit geld ook voor monsters van de incubatie experimenten waarin organismen van de 0.2 μm filter meer DNA schade hebben dan organismen van de 1 μm filter. De gevoeligheid voor UV-B straling van de organismen < 1 μm kan worden veroorzaakt doordat er bijvoorbeeld meer bacterioplankton in deze monsters gezeten heeft. Bacterioplankton is gevoeliger voor UV-B straling door onder andere het ontbreken van schaduwpigmenten, klein celoppervlak, het DNA is kaler omdat in de cel minder storende factoren zijn zoals kern, die UV-B tegenhouden. Wanneer het effect van mixing werd uitgesloten dan is de invloed van UV-B straling in relatie tot de diepte beter te bestuderen, dit is in het incubatie experiment gebeurd.
De donkerzak werd in het incubatie experiment als controlezak beschouwd. Een toename van DNA schade in deze zak is niet mogelijk. Wanneer de resultaten dit wel laten zien kan dit te maken hebben met de nauwkeurigheid van de analyse van DNA schade of een verschil in het water tussen de monsteringen. Elke andere zak van dat monsterpunt met dezelfde toename in DNA schade heeft dan in principe geen toename in DNA schade. Deze onnauwkeurigheid komt ook naar voren wanneer de schade rond 1 dimeer per 10^6 nucleotiden ligt. Door de variatie in de analyse kan deze hoogte van DNA schade als nihil worden beschouwd. Wanneer de donkerzak een afname in DNA schade laat zien dan kan dit te wijten zijn aan of de nauwkeurigheid van de analyse methode, reparatie van DNA schade of dat er toevallig net ander water gemonsterd is. In de Annabaai laten alleen alle 0.5 meter monsters een toename in DNA schade zien. Deze diepte was voor dit monsterpunt de enige diepte waar volgens de 1% diepte resultaten nog UV-B straling aanwezig was. Bij monstertocht 1, 0.2 μm filter, 14-11-1996 is er een afname van DNA schade in de 2 meter en de donkerzak. Dit kan komen door donker en licht reparatie, want al is UV-B straling op 2 meter diepte uitgedoofd zichtbaar licht en PAR is daar nog wel aanwezig. De fotoreparatie lijkt effectiever. De tweede meting in de Annabaai, 21-11-1996, laat uitgezonderd van de 0.5 meter zak nauwelijks schade zien. Op deze dag en ook op 9-12-1996 lag er olie op het water in de Annabaai. De film van olie kan invloed hebben gehad op de instraling van UV-B.
De resultaten van de Open Oceaan laten zien dat op 19-11-1996 de DNA schade op 8 meter diepte (is boven de 1% diepte van de Open Oceaan) toeneemt voor organismen van de 0.2 μm filter. Op deze dag was het windstil en zonnig weer dit in tegenstelling tot 3-12-1996, waar nauwelijks DNA schade gemeten is. Ondanks het verschil in weer is er op beide dagen een toename in DNA schade te zien op de 1 μm filter van de 0.5 meter zakken en zelfs op 3-12-1996 in de 2 meter zak. In geen van de monsters is sprake van reparatie.
De DNA schade op het begin van dag 25-11-1996 is hoog in de Pestbaai. Deze dag was één van de eerste dagen na het windstille zonnige weer veroorzaakt door een tropische storm in het Caribische gebied. Het lijkt erop dat er in deze periode een opbouw van DNA schade heeft plaatsgevonden. Dat hier geen toename in DNA schade is, kan komen de organismen hun DNA schade effectief kunnen repareren. Verder is geen verschil in de afname van DNA schade op 25-11-1996, 0.2 μm filter tussen de 5 meter en de donker zak. In de loop van de dag blijft de DNA schade van de 1 μm filter van de donkerzak vrijwel gelijk, terwijl alle andere zakken in DNA schade afne-

men. Waarschijnlijk treedt hier lichtreparatie op. Misschien kunnen de organismen op de 1 µm filter na een periode van veel zon en DNA schade effectiever hun DNA schade repareren.
Kort samengevat, wanneer mixing wordt uitgesloten dan neemt de DNA schade in de loop van de dag toe op plaatsen waar deze aan de hand van de 1% dieptes ook worden verwacht (Annabaai op 0.5 meter diepte, Open Oceaan op 8 meter diepte voor de 0.2 µm filter en Open Oceaan op 0.5 en 2 meter diepte op de 1 µm filter). Monsterpunt Pestbaai is een uitzondering en verschilt met de andere monsterpunten door de hoge beginwaarden van DNA schade. Organismen van 0.2 µm filter zijn gevoeliger voor DNA schade en daardoor zijn de effecten dieper in de waterkolom merkbaar. Beide grootte fracties kunnen waarschijnlijk DNA schade repareren. Na een langere periode van UV-B straling lijkt het erop dat de organismen sneller DNA schade repareren onder invloed van licht, lichtereparatie, dan met donkerreparatie.
Wanneer de data van incubatiezakken vergeleken wordt met de ruwe data van Petra Visser is het mogelijk dat de bacteriële produktie en de DNA schade omgekeerd evenredig zijn.

Over het algemeen kan voor de veldmonsters en incubatie experimenten worden vastgesteld dat DNA schade in het veld aantoonbaar is. Hieruit blijkt dat UV-B straling in de tropen een natuurlijke stressfactor is op het plankton. Door middel van een soorten indicatie zou kunnen worden bepaald welke soorten plankton in de monsters zitten. Bij het incubatie experiment moet dan wel rekening worden gehouden met eventueel opgetreden successie in de zak o.a. veroorzaakt door een tekort aan nutriënten. De DNA schade die in deze studie bepaald is, is eigenlijk de DNA schade die is ontstaan min de reparatie hiervan. Voor elk organisme/soort is dan belangrijk hoe effectief het metabolisme is. UV-A straling en ook PAR kunnen dieper doordringen in de waterkolom dan UV-B straling en zijn mogelijk ecologisch gezien meer relevant dan in eerste instantie werd gedacht. Tijdelijke regionale verschillen (zoals in aanwezigheid van nutriënten, bacteriële en algen soortensamenstelling) kunnen het resultaat zijn van het treffen van verschillende condities in de waterkolom. Uit deze studie blijkt dat onder andere mixing en het watertype (hoeveelheid nutriënten en organisch opgelost materiaal) van invloed is op de mate van UV-B specifieke DNA schade.
De resultaten van de veldmonsters en van de monsters van het incubatie experiment zijn variabel. Een verbetering van de immunoslotblot techniek kan een betrouwbaardere analyse van DNA schade opleveren. Het is helaas onbekend wat de maximale hoeveelheid DNA is wat op de nylonfilter kan worden opgebracht. De achtergrond op de film, waarschijnlijk veroorzaakt door a-specifieke binding op de nylonfilter, kan de oorzaak zijn dat lage DNA schade moeilijk detecteerbaar is. De monsters zonder DNA schade bewijzen dat de kans op meten van DNA schade wat niet van de opgebrachte monsters afkomstig is, klein is.
Voor een vervolg van deze studie is het van belang om bij het filtreren met duplo's te werken. De beperking van de filtratie opstelling heeft er in dit onderzoek voor gezorgd dat er geen duplo's zijn genomen. Door deze studie is een indicatie gegeven waar, wanneer en wat in een veldsituatie te verwachten is. Bij vervolgexperimenten is het belangrijk dat er minder variabelen worden meegenomen. Nu is er namelijk verschil in locatie, tijd, monsterdag, dieptes en verschillende monsterfracties,

deze kunnen worden beperkt door bijvoorbeeld op 1 locatie te monsteren op 1 diepte over de gehele dag. Met dit soort gegevens is het eenvoudiger en nuttiger om statistisch te analyseren. Het uitbreiden van een reparatie experiment is ook een mogelijkheid. Bovendien kan er meer gecombineerd worden met bijvoorbeeld meteodata of andere externe factoren. Om meer inzicht in de mechanismen van UV-B schade en de manier hoe organismen hierop reageren te krijgen zouden de onderzoeksresultaten van tropische studies naar de effecten van UV-B straling na verloop van tijd vergeleken moeten worden met de situatie in polaire gebieden.

LITERATUUR

Aas, P., M. Lyons, R. Pledger, D.L. Mitchell and W.H. Jeffrey (1996) Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. *Aquatic Microbial Ecology* **11**: 229-238.

Behrenfeld, M.J., J.T. Hardy, H.I.I. Lee (1992) Chronic effects of ultraviolet-B radiation on growth and cell volume of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *J Phycol.* **28**: 757-760.

Behrenfeld, M.J., J. Hardy, H. Gucinski, A. Hanneman, H.I.I. Lee, A. Wones (1993) Effects of ultraviolet-B radiation on primary production along latitudinal transects in the South Pacific Ocean. *Mar. Environ. Res.* **35**: 349-363.

Behrenfeld, M.J., H.I.I. Lee and L.F. Small (1994) Interactions between nutritional status and long-term responses to ultraviolet-B radiation stress in a marine diatiom. *Marine Biology* **118**: 523-530.

Behrenfeld, M.J., D.R.S. Lean, H.I.I. Lee (1995) Ultraviolet-B radiation effects on inorganic nitrogen uptake by natural assemblages of oceanic phytoplankton. *J. Phycol.* **31**: 25-36.

Bidigare, R.R. (1989) Potential effects of UV-B radiation on marine organisms of the Southern Ocean, distributions of phytoplankton and krill during Austral spring. *Photochemistry and Photobiology* **50**: 469-477.

Bothwell, M.L., D. Sherbot, A.C. Roberge and R.j. Daley (1993) Influence of natural ultraviolet radiation on lotic periphytic diatom community growth, biomass accrual, and species composition: short term versus long term effects. *J. Phycol.* **28**: 24-35.

Bothwell, M.L., D.M.J. Sherbot, C.M. Pollock (1994) Ecosystem response to solar ultraviolet-B radiation: influence of trophic-level interactions. *Science* **265**: 97-100.

Buma, A.G.J., E.J. van Hannen, L. Roza, M.J.W. Veldhuis and W.W.-C. Gieskes (1995) Monitoring ultraviolet-B induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluoriscent thymine dimer detection. *J. Phycol.* **31**: 314-321.

Buma, A.G.J., H.J. Zemmelink, K. Sjollema, W.W.C. Gieskes (1996) UVB radiation modifies protein and photosynthetic pigment content, volume and ultrastructure of marine diatoms. *Marine Ecology Progress Series* **142**: 47-54.

Buma, A.G.J., A.H. Engelen, W.W.C. Gieskes (1997) Wavelength-dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. *Marine Ecology Progress Series* **153**: 91-97.

Crutzen, P.J. (1992) Ultraviolet on the increase. *Nature* **356**, 104-105.

Cullen, J.J., M.P. Lesser (1991) Inhibition of photosynthesis by ultraviolet radiation as a function of dose and dosage rate: results for a marine diatiom. *Marine Biology* **111**: 183-190.

Deladillo-Hinojosa, F., G. Gaxiola-Castro, J.A. Segovia-Zavala, A. Muñoz-Barbosa and M.V. Orozco-Borbón (1997) The effect of vertical mixing on primary production in a bay of the Gulf of California. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **45**: 135-148.

Donkor, V.A., D.P. Häder (1996) Effects of ultraviolet irradiation on photosynthetic pigments in some filamentous cyanobacteria. *Aquatic Microbial Ecology* **11**: 143-149.

Döhler, G., and H. Stolter (1986) Impact of UV-B (290-320 nm) radiation on photosynthesismediated uptake of ^{15}N-ammonia and ^{15}N-nitrate of several marine diatoms. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **181**: 533-539.

Döhler, G., E. Hafmeier, E. Grigoleit and K.D. Krauwe (1991) Impact of solar UV radiation on uptake of ^{15}N-ammonia and ^{15}N-nitrate of marine diatoms and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **187**: 293-303.

El-Sayed, S.Z., F.C. Stephens, R.R. Bidigare, M.E. Ondrusek (1990) Effects of ultraviolet radiation on Antarctic marine phytoplankton. In: Kerry, K.R., G. Hempel (eds) Antarctic ecosystems. Ecological change and conservation. Springer-Verlag, Berlin, p 379-385.

Farman, J.C., B.G. Gardiner and J.D. Shanklin (1985) Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal CL_{ox}/NO_x interaction. *Nature* **315**, 207-210.

Fleischmann, E.M. (1986) Ultraviolet radiation : penetration into natural waters and effects on coral-zooxanthellae productivity. PhD Dissertation, University of Georgia, Athens.

Gieskes, W.W.C., G.W. Kraay (1990) Transmission of ultraviolet light in the Wedell Sea: report on the first measurement made in Anarctic. *Biomass. Newsl* **12**: 12-14.

Goes, J.I., N. Handa, S. Taguchi, T. Hama, H. Siato (1995) Impact of UV radiation of dissolved free and combined amino acids in marine phytoplankton. *J. Plankton. Res.* **17**(6): 1337-1362.

Häder, D.P (1993) Risk of enhanced solar ultraviolet radiation for aquatic ecosystems. *Progress in Phycological Research* **9**: 1-45.

Helbling, E.W., V. Villafañe, M. Ferrario, O. Holm-Hansen (1992) Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Marine Ecology Progress Series* **89**: 89-100.

Herndl, G.J., G. Müller-Niklas, J. Frick (1993) Major role of ultraviolet-B in controlling bacterioplankton growth in the surface layer of the ocean. *Nature* **361**: 717-719.

Jeffrey, W.H. et al. (1995) Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. ASLO-meeting *Am. Soc. Limn. Oceanogr.* Programm/book of Abstracts: 22.

Jeffrey, W.H., P. Aas, M.M. Lyons, R.B. Coffin, R.J. Pledger and D.L. Mitchell (1996a) Ambient solar radiation-induced photodamage in marine bacterioplankton. Symposium-in-print *Photochemistry and Photobiology* **64**(3): 419-427.

Jeffrey, W.H., R.J. Pledger, P. Aas, S. Hager, R.B. Coffin, R. von Haven, D.L. Mitchell (1996b) Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. *Marine Ecology Progress Series* **137**: 283-291.

Jerlov, N.G. (1950) Ultraviolet radiation in the sea. *Nature* **166**: 111-112.

Jokiel, P.L. and J.R. York (1984) Importance of ultraviolet radiation in photoinhibition of microalgal growth. *Limnol. Oceanogr.* **24**(1): 192-199.

Karentz, D., L.H. Lutze (1990) Evaluation of biological harmful ultraviolet radiation in Antarctica with a biological dosimeter designed for aquatic environments. *Limnol. Oceanogr.* **35**: 245-257 of 549-561.

Karentz, D., J.E. Cleaver and D.I. Mitchell (1991) Cell survival characteristics and molecular reponses of Antarctoc phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *J. Phycol.* **27**: 326-341.

Kirchman, D.L. (1993) Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria. In Kemp, P.F. (ed) Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publishers. Boca Raton, p 509-512.

Kloff, S.R. en W.J. Steinhoff (1994) Effecten van eutrofiëring op de fytoplanktongemeenschap boven het koraalrif van Curaçao. doctoraalverslag Universiteit van Amsterdam en het Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee.

Laurion, I., W.F. Vincent and D.R.S. Lean (1997) Underwater ultravioler radiation: development of spectral models for northern high latitude lakes. *Photochemistry and Photobiology* **65**(1): 107-114.

Lesser, M.P., J.J. Cullen, P.J. Neale (1994) Carbon uptake in a marine diatom during acute exposure to ultraviolet B radiation: relative importance of damage and repair. *J. Phycol.* **30**: 183-192.

Lesser, M.P., et al. (1995) Bleaching in coral reef anthocoans: effects of irradiance ultraviolet radiation, and temperature on the activities of protective enzymes against active oxygen. *Coral Reefs* **8**: 225-232.

Li, W.K.W., et al. (1983) Autotrophic picoplankton in the tropical ocean. *Science* **219**: 292-295.

Madronich, S. (1992) Implications of recent toal atmospheric ozone measurements for biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Geophys. Res. Lett.* **19**: 37-40.

Madronich, S. (1995) The radiation equation. *Nature* **377**: 682.

Mitchell, D.L. (1988) The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochemistry and Photobiology* **48**: 51-59.

Mitchell, D.L., an R.S. Nairn (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. Annual review. *Photochemistry and Photobiology* **49**: 805-819.

Mitchel, D.L., D.E. Brash and R.S. Nairn (1990) Rapid raepair of pyrimidine(6-4) pyrimidone photoproducts in human cells does not result from change in epitope conformation. *Nucl. Acids Res.* **18**: 963-971.

Palenik, B., N.M. Price, F.M.M. Morel (1991) Potential effects of UV-B on the chemical environment of marine organisms: a review. *Environ. Poll.* **70**: 117-130.

Peak, M.J. and V. Peak (1989) Solar-ultraviolet induced damage to DNA. *Photodematology* **6**: 1-15.

Quesada, A., J.L. Mouget and W.F.Vincent (1995) Growth of Antarctic cyanobacteria under ultraviolet radiation: UVA counteracts UVB inhibition. *J. Phycol.* **31**: 242-248.

Roy, C.R., H.P. Gies, D.W. Tomlinson and D.L. Lugg (1994) Effects of ozone depletion on the ultraviolet radiation environment at the Australian stations in Antarctica. In: Weiler, C.S. and P.A. Penhale (eds) Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects. *Antarctic Res. Ser.* **62**: 1-15.

Sancar, A. and G.B. Sancar (1981) DNA repair enzymes. Annual review. *Biochemistry* **57**: 29-67.

Scully, N.M., D.R.S. Lean (1994) The attenuation of ultraviolet radiation in temperate lakes. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeb. Limnol* **43**: 135-144.

Setlow, R.B. (1974) The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: A theoretical analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **71**: 3363-3366.

Simon, M and F. Azam (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria in filtered seawater. *Marine Ecology Progress Series* **51**: 201-213.

Sommaruga, R., A. Oberletter, and R. Psenner (1996) Effect of UV radiation on the bacterivory of a heterotrophic nanoflagellate. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(12): 4395-4400.

Smith, R.C. B.B. Prezelin, K.S. Baker, R.R. Bidigare, N.P. Boucher, T. Coley, D. Karentz, S. MacIntyre, H.A. Matlick, D. Menzies, M. Ondrusek, Z. Wan, K.J. Waters (1992) Ozone depletion: ultraviolet rdiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* **255**: 952-959.

Spoelstra, S. (1996) The use of specific antibodies for the detection of thymine dimers in UV-B irradiated algal cells. R*u*G, Groningen.

Stolarski, R.R., L. Bojkov, L. Bishop, C. Zerefos, J. Stachelin and J. Zawodny (1992) Measured trends in stratospheric ozone. *Science* **256**, 342-349.

Weiler, C.S., and P.A. Penhale (1994) Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects. *Antarctic Res. Ser.* **62**, Am. Geophys. Union, Washington, DC.

Wetzel, R.G., P.G. Hatcher, T.S. Bianchi (1995) Natural photlysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapid bacterial metabolism. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 1369-1380.

Williamson C.E. and H.E. Zagarese (1994) Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems. *Hydrobiol. beih. Ergebn. Limnol.* **43**: 1-226.

Worrest, R.C. (1981) Sensivity of marine phytoplankton to UV-B radiation: impact upon a model ecosystem. *Photochemistry and Photobiology* **33**: 223-227.

Worrest, R.C. (1983) Impact of solar ultraviolet-B radiation (290-320 nm) upon marine microalgae. *Physiol. Plant.* **58**: 428-434.

Worrest, R.C., H. van Dyke and B.E. Thomson (1987) Impact of enhanced simulated solar ultraviolet radiation upon a marine community. *Photochemistry and Photobiology* **27**: 471-478.

Urbach, F., and R.W. Gange (ed.) (1986) The biological effects of ultraviolet A radiation. Praeger Publishers, New York.

Zolzer, F. and J. Kiefer (1989) Zellulare Wirkungen der ultravioletten Komponente des Sonnenlichts. *Naturwissenschaften* **76**: 489-495.

INHOUD BIJLAGES

Tabel A: Annabaai, Open Oceaan en Pestbaai, gegevens en resultaten

Protocol Biodosimeter

Protocol Filtreren + figuur filtratie opstelling

Protocol DNA isolatie met SDS

Protocol DNA isolatie met CTAB

Protocol DNA isolatie met CTAB voor GF/F filters

Protocol DNA analyse met behulp van PicoGreen® en fluorimeter

Protocol instelling fluorimeter

Protocol Immunoslotblot

Protocol PBB verdunningen

Protocol HH-DNA

Bijlage: gebruikte buffers, stockoplossingen (etc.)

TABEL A: Annabaai, Open Oceaan en Pestbaai gegevens en resultaten

Annabaai	tijd	DNA schade	diepte (m)	filter		DNA concentratie ng/ml	totaal geisoleerd in ug
AB1-2	10:00	0.23	0	1		16325.63	4.08
AB1-4	10:00	0.38	5	1		21302.39	5.33
AB1-6	0:00	0.00	2	1		10189.29	2.55
AB1-8	13:00	0.30	8	1		15728.93	3.93
AB1-10	14:28	0.79	0	1		13725.56	3.43
AB1-12	14:28	0.91	5	1		19443.04	4.86
AB1-14	16:30	1.72	0.5	1	zak	18687.23	4.67
AB1-16	16:30	0.59	2	1	zak	18857.26	4.71
AB1-18	18:40	0.63	dark	1	zak	13163.89	3.29
AB1-1	10:00	8.44	0	0.2		9086.76	2.27
AB1-3	10:00	6.17	5	0.2		6100.98	1.53
AB1-5	13:00	2.19	2	0.2		1483.06	0.37
AB1-7	13:00	3.47	8	0.2		4496.73	1.12
AB1-9	6:43		0	0.2		200.88	0.05
AB1-11	14:28	7.16	5	0.2		5012.13	1.25
AB1-13	16:30	12.29	0.5	0.2	zak	4211.32	1.05
AB1-15	16:30	3.20	2	0.2	zak	2475.18	0.62
AB1-17	18:40	5.51	dark	0.2	zak	2018.73	0.50
AB2-1	9:05	0.33	0	0.2		15000.54	3.75
AB2-3	16:13	0.81	2	0.2	zak	13919.37	3.48
AB2-5	16:13	0.40	5	0.2	zak	14179.99	3.54
AB2-7	17:31	0.18	dark	0.2	zak	13580.90	3.40
AB2-9	7:26		0.5	0.2	zak	0.00	0.00
AB2-2	9:05	0.33	0	1		25961.03	6.49
AB2-4	16:13	0.91	2	1	zak	20715.44	5.18
AB2-6	16:13	0.40	5	1	zak	32974.89	8.24
AB2-8	17:31	0.78	dark	1	zak	23241.13	5.81
AB2-10	17:31	1.70	0.5	1	zak	21853.93	5.46

Annabaai	tijd	DNA schade	diepte (m)	filter		DNA concentratie ng/ml	totaal geisoleerd in ug
AB2-11	12:45	0.41	2	GFF			
AB2-12	12:45	0.51	8	GFF			
AB2-13	13:45	1.24	0	GFF			
AB2-14	13:45	0.85	5	GFF			
DNA monster	DNAmonsters	DNA gebruikt (ul)	ug in epje			DNA concentratie in ng/ml	totaal geisoleerd in ug
AB 2 meter GFF 12.45	AB2-11	10	1.03			1882.09	0.94
AB 2 meter GFF 12.45		5				2131.13	1.07
AB 2 meter GFF 12.45		2.5				2176.71	1.09
AB 2 meter GFF 12.45	AB2-11 A					35117.86	17.56
AB 2 meter GFF 12.45	AB2-11 B					13058.78	6.53
AB 8 meter GFF 12.45	AB2-12		14.01			28021.27	14.01
AB 0 meter GFF 13.45	AB2-13	10	1.36			2484.69	1.24
AB 0 meter GFF 13.45		5				2964.67	1.48
AB 0 meter GFF 13.45		2.5				2694.52	1.35
AB 0 meter GFF 13.45	AB2-13 A					25237.22	12.62
AB 0 meter GFF 13.45	AB2-13 B					33748.24	16.87
AB 5 meter GFF 13.45	AB2-14		15.86			31722.56	15.86
Annabaai	**tijd**	**DNA schade**	**diepte (m)**	**filter**		**DNA concentratie ng/ml**	**totaal geisoleerd in ug**
AB3-1	10.4	0	0	0.2		13961.76	3.49
AB3-3	14.23	0	2	0.2	zak	19934.04	4.98
AB3-5	14:23	0.43	5	0.2	zak	13112.44	3.28
AB3-7	15:47	0.75	0.5	0.2	zak	9101.59	2.28
AB3-9	15:47	0.25	dark	0.2	zak	9694.40	2.42
AB3-2	10:40	0.00	0	1		21806.35	5.45
AB3-4	14:23	0.45	2	1	zak	4739.93	1.18
AB3-6	14:23	0.12	5	1	zak	27052.79	6.76
AB3-8	15:47	0.11	0.5	1	zak	11675.93	2.92
AB3-10	15:47	0.46	dark	1	zak	12513.79	3.13

Open Oceaan	tijd	DNA schade	diepte (m)	filter		DNA concentratie ng/ml	totaal geisoleerd in ug
OO1-2	9:45	1.25	5	1		10734.64	2.68
OO1-4	13:00	1.47	2	1		12471.47	3.12
OO1-6	13:00	3.06	15	1		16043.97	4.01
OO1-8	14:45	1.06	0	1		11546.71	2.89
OO1-10	14:45	1.87	5	1		8863.48	2.22
OO1-12	16:30	3.13	0.5	1	zak	8863.64	2.22
OO1-14	16:30	4.77	5	1	zak	14146.63	3.54
OO1-1	9:45	1.15	5	0.2		3498.43	0.87
OO1-3	13:00		2	0.2		2021.30	0.49
OO1-5	13:00	2.72	15	0.2		4795.77	1.20
OO1-7	14:45	11.03	0	0.2		6726.57	1.68
OO1-9	14:45	5.46	5	0.2		3040.36	0.76
OO1-11	16:30	12.35	0.5	0.2	zak	4431.50	1.11
OO1-13	16:30	18.29	5	0.2	zak	1478.61	0.37
OO2-1	9:00	1.69	0	0.2		14361.55	3.59
OO2-3	16:04		2	0.2	zak	26.39	0.01
OO2-5	15:58	12.44	8	0.2	zak	8375.33	2.09
OO2-7	17:00	3.28	dark	0.2	zak	3730.35	0.93
OO2-9	17:00		0.5	0.2	zak	411.58	0.10
OO2-2	9:00	0.80	0	1		22301.19	5.58
OO2-4	16:04	2.28	2	1	zak	18077.73	4.52
OO2-6	15:58	1.66	8	1	zak	17057.34	4.26
OO2-8	17:00	2.85	dark	1	zak	23293.47	5.82
OO2-10	17:00	5.46	0.5	1	zak	9278.28	2.32

Open Oceaan	tijd	DNA schade	diepte (m)	filter		DNA concentratie ng/ml	totaal geisoleerd in ug
OO2-11	13:00	0.93	2	GFF			
OO2-12	13:00	1.09	15	GFF			
OO2-13	14:30	1.48	0	GFF			
OO2-14	14:30	11.57	5	GFF			
DNA monster	DNAmonsters					DNA concentratie in ng/ml	totaal geisoleerd in ug
OO 2 meter GFF 13.00	OO2-11					31986.63	15.99
OO 15 meter GFF 13.00	OO2-12 A					17369.43	8.68
OO 15 meter GFF 13.00	OO2-12 B					6522.93	3.26
OO 0 meter GFF 14.30	OO2-13					7778.85	3.89
OO 0 meter GFF 14.30						7510.60	3.76
OO 0 meter GFF 14.30						6434.10	3.22
OO 0 meter GFF 14.30	OO2-13 A					26198.27	13.10
OO 0 meter GFF 14.30	OO2-13 B					33843.58	16.92
OO 5 meter GFF 14.30	OO2-14 A					12491.67	6.25
OO 5 meter GFF 14.30	OO2-14 B					13601.87	6.80
Open Oceaan	**tijd**	**DNA schade**	**diepte (m)**	**filter**		**DNA concentratie ng/ml**	**totaal geisoleerd in ug**
OO3-1	10:29	0.39	0	0.2		9713.11	2.43
OO3-3	14:20	1.25	0.5	0.2	zak	4563.77	1.14
OO3-5	14:20	1.33	2	0.2	zak	3790.69	0.95
OO3-7	15:37		dark	0.2	zak	297.81	**0.07**
OO3-2	10:29	0.37	0	1		30209.14	7.55
OO3-4	14:20	2.66	0.5	1	zak	6487.01	1.62
OO3-6	14:20	2.50	2	1	zak	15682.68	3.92
OO3-8	15:37	0.95	dark	1	zak	11064.30	2.77
OO3-9	12:53	0.75	0	GFF		39078.63	19.54
OO3-10	12:53	0.05	10	GFF		38486.97	19.24

Pestbaai	tijd	DNA schade (T<>T/10^6 nucleotiden)	diepte (m)	filter		DNA concentratie ug/ml	totaal geisoleerd in ug
PB1-3	10:15	niet opgebracht	5	1		314.57	0.08
PB1-5	13:04	0.81	2	1		6652.63	1.66
PB1-7	13:04	0.00	15	1		12207.71	2.93
PB1-9	14:35	2.09	0	1		5978.86	1.49
PB1-11	14:35	1.94	5	1		2231.29	0.56
PB1-13	16:00	*16.23, heel weinig DNA opgebracht	0	1			
PB1-15	16:00	0.62	5	1		4184.69	1.05
PB1-17	17:15	0.48	0.5	1	zak	5889.76	1.47
PB1-19	17:15	0.43	5	1	zak	913.78	0.23
PB1-1	10:15	0.17	0	0.2		3735.49	0.93
PB1-2	10:15	1.21	5	0.2		1720.60	0.43
PB1-4	13:04	7.03	2	0.2		1724.60	0.43
PB1-6	13:04	7.99	15	0.2		1638.30	0.41
PB1-8	14:35	niet opgebracht	0	0.2		1338.12	0.32
PB1-10	14:35	2.53	5	0.2		3581.30	0.90
PB1-12	16:00	niet opgebracht	0	0.2		623.24	0.15
PB1-14	16:00	*13.74, heel weinig DNA opgebracht	5	0.2		4271.22	1.03
PB1-16	17:15	niet opgebracht	0.5	0.2	zak	2128.17	0.51
PB1-18	17:15	9.28	5	0.2	zak	2439.36	0.61
PB2-1	9:50	11.84	0	0.2		2873.78	0.72
PB2-3	16:15	12.61	2	0.2	zak	5889.11	1.47
PB2-5	16:15	7.19	5	0.2	zak	10957.46	2.74
PB2-7	17:34	niet opgebracht	0.5	0.2	zak	23.57	0.01
PB2-9	17:34	6.17	dark	0.2	zak	6833.49	1.71
PB2-2	9:50	2.56	0	1		18989.99	4.75
PB2-4	16:15	1.65	2	1	zak	21066.25	5.27
PB2-6	16:15	1.26	5	1	zak	29218.59	7.30
PB2-8	17:34	1.31	0.5	1	zak	18050.91	4.51
PB2-10	17:34	2.97	dark	1	zak	20553.67	5.14

Pestbaai	tijd		diepte (m)	filter		DNA concentratie ug/ml	totaal geisoleerd in ug
PB2-11	12:55	0.61	2	GFF		39283.75	19.64
PB2-12	12:55	0.67	8	GFF		29056.29	14.53
PB2-13	13:50	0.91	0	GFF		35301.98	17.65
PB2-14	13:50	1.46	5	GFF		38830.97	19.42
PB3-1	10:43	2.17	0	0.2		16170.71	4.04
PB3-3	14:15	0.42	2	0.2	zak	11609.97	2.90
PB3-5	14:15	2.50	5	0.2	zak	5374.70	1.34
PB3-7	15:37	2.42	0.5	0.2	zak	10052.12	2.51
PB3-9	15:37	1.50	dark	0.2	zak	10945.35	2.74
PB3-2	10:43	1.06	0	1		32582.13	8.15
PB3-4	14:15	1.29	2	1	zak	15712.09	3.93
PB3-6	14:15	1.55	5	1	zak	26233.97	6.56
PB3-8	15:37	1.09	0.5	1	zak		
PB3-8a						2339.25	0.58
PB3-8b						2690.99	0.67
PB3-10	15:37	0.55	dark	1	zak	16671.44	4.17

Protocol Biodosismeter

- 10 μg kalfs thymus DNA per ml TE (OD_{260} = 0.2)
- 1.5 ml quartzbuisjes met steriele pasteurpipet volpipeteren
- quartzbuisjes afsluiten met een stukje parafilm
- de quarzbuisjes worden per tweetal op verschillende dieptes gehangen
- na het biodosismeter experiment de quartzbuisjes bewaren bij 4 ° of bij -20 °C
- DNA uit buisjes halen met steriele pasteurpipet en overbrengen in steriele 1.5 ml epjes, bewaren bij 4 ° of bij -20 °C
- lege buisjes in bak met demi

Schoonmaken van de quartzbuisjes

- van plastic slangetjes, pasteurpipetten, verbindingstukken en en reageerbuisrekje een spoelapparaat bouwen
- spoelapparaat in gootsteen
- buizen leegschudden en omgekeerd op spoelapparaat plaatsen
- spoelapparaat aansluiten op vat met demi en een scheut HCl
- hell vat per rek buisjes laten leeglopen
- buisjes tussendoor bewaren in bekerglas demi
- spoelapparaat aansluiten op kraan
- 30 minuten per rek buisjes spoelen
- buisjes tussendoor bewaren in bekerglas demi
- spoelapparaat aansluiten op demikraan
- 30 minuten per rek buisjes spoelen (spoel ook buitenkant af)
- buisjes leegschudden
- buisjes omgekeerd in klein bekerglas afdekken met aluminiumfolie
- steriliseer 3 uur in 180 °C in stoof

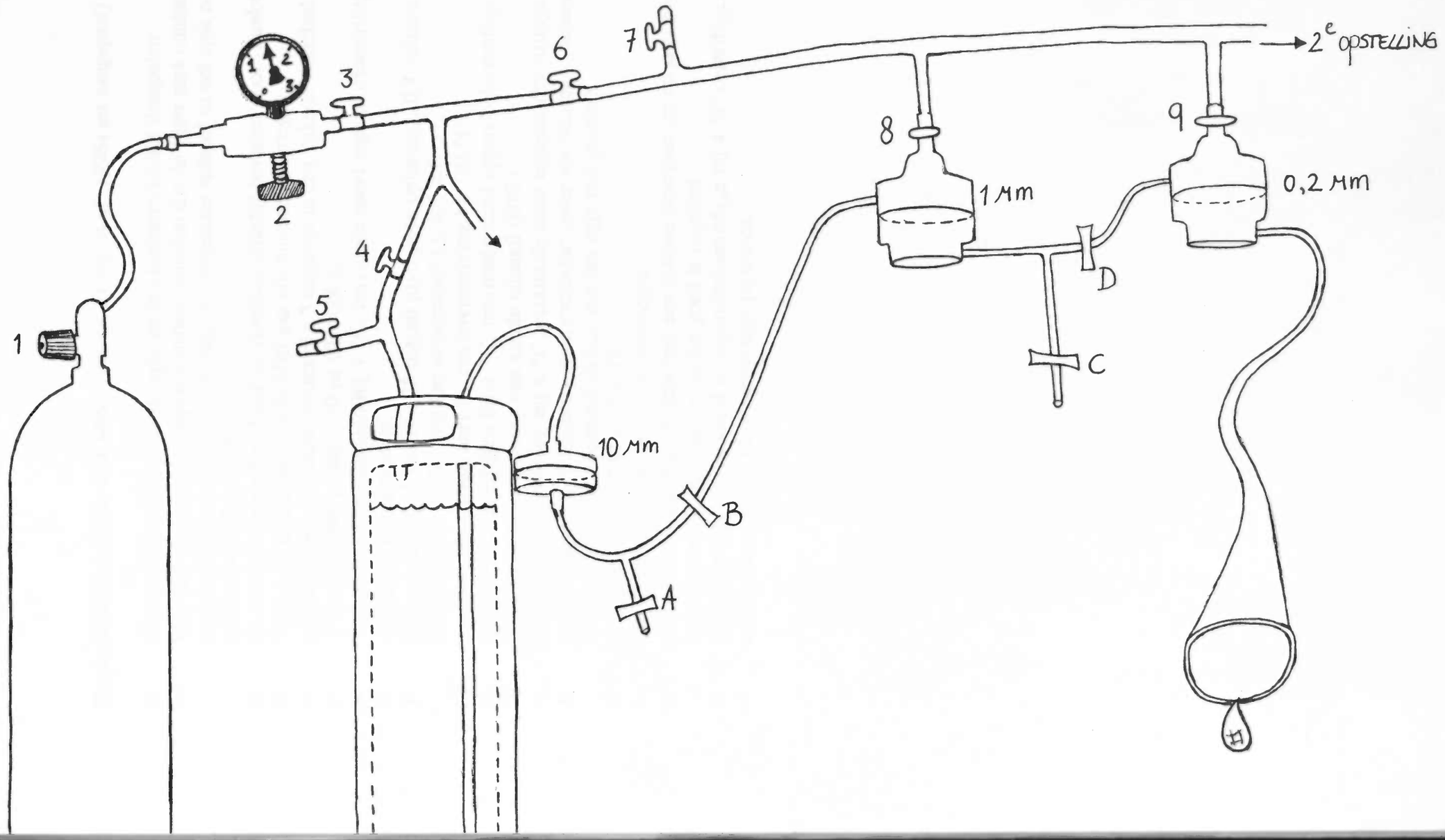
Protocol Filtreren (+ figuur filtratie opstelling)
Filtratie van zeewater op 47 mm polycarbonaat filters (Poretics)

Van belang is dat de filtratie in het donker plaats vindt en dat de filters direct na de filtratie worden ingevroren in vloeibare stikstof.

- filtratie duurt niet langer dan 1 uur
- filtratie vindt plaats "in line"; 10 μm - 1 μm - 0.2 μm
- filters op filterhouder leggen en wat nat maken
- filterhouder dichtdraaien
- luchtslang op het colavaatje bevestigen
- filtratie opstelling omdraaien (= figuur andersom), zodat de filters altijd nat blijven tijdens de filtratie
- 10 μm filterhouder vastmaken aan het colavaatje, zoals is afgebeeld
- Klemmen aanbrengen: A + C
- kranen dicht: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
- kraan 1 open, met 2 de druk op 1½ bar instellen (eventueel eerst ontluchten door openen van 3, 6, 7)
- 3 en 4 opendraaien, 30 minuten filtreren, filtraat wordt opgevangen en een jerrycan met maataangeving.
- na een half uur wordt de 0.2 μm filter afgekoppeld, omdat met alle filters het filtreren erg langzaam gaat, daarvoor wordt D afgeklemt en C losgemaakt, de hoeveelheid gefiltreerde liters noteren.
- nogmaals 30 minuten filtreren
- eventueel monsters nemen: uit M_2 (1 μm < M < 0,2 μm)
  uit M_1 (10 μm < M < 1 μm)
- voor monstername M_1 eerst B afklemmen; daarna A verwijderen; monsternemen; hierna A afklemmen en B verwijderen (anders scheuren de filters).
- Filtratie stoppen: B afklemmen; 6 openen; daarna 8 en 9 openen om laatste restje boven de filters weg te blazen (Eventueel druk met 2 een beetje opvoeren); 8 en 9 dicht en daarna 6 dicht
- opstelling omdraaien; schroeven los; filters verwijderen; opvouwen en in aluminiumfolie en daarna in vloeibaar stikstof, hierna bewaren in diepvries (- 20 °C of - 80 °C)
- ontluchten door 4 dicht te draaien en 5 te openen.
- hoeveelheid filtraat noteren

- voor filtratie met 10 μm filter en GF/F filter is het gebruik van de '0.2 μm filterhouder' niet nodig, dus geen afkoppeling na 30 minuten

- de filtratie voor de pigmentbepaling en de yellow substance gaat met alleen een GF/F filter in de 10 μm filterhouder te plaatsen en daarna 10 liter monster door de filtratie opstelling laten lopen


1
2
3
4
5
6
7
8
9
1 mm
0,2 mm
10 mm
A
B
C
D
H
2e OPSTELLING

Protocol DNA isolatie met SDS (volgens Jeffrey et al, 1996a en aangepast)

- Polycarbonaatfilter in 2 ml epje en in vloeibare stikstof dompelen
- met een disposable stampertje malen, opletten dat de filter niet ontdooit, lijkt dit wel te gebeuren dan met een leeg epje vloeibare stikstof in het epje met filter gieten (veiligheidsbril op!)
- na het malen epje met filter in vloeibare stikstof bewaren voor 'direkt' gebruik
- 750 μl STE met hierin 1% SDS aan elk monster toevoegen
- epje zachtjes schudden (vortex) en 5 minuten in een kokend waterbad plaatsen
- 1 keer extraheren met 750 μl CIA (24:1)
- 10 minuten centrifugeren bij 4 °C, maximale stand eppendorfcentrifuge
- waterfase in nieuw epje
- toevoegen 0.4 μl van een 25 mg/ml glycogeen oplossing, 0.1 volume (75 μl) 3 M NaAc (pH 5) en 2/3 volume isopropanol ($\pm$ 0.5 ml)
- (• nucleïnezuren slaan neer na een overnachting bij -20 °C)
- 30 minuten centrifugen bij 4 °C, maximale stand eppendorfcentrifuge
- afgieten en pellet wassen met koude ethanol (80%)
- 30 minuten centrifugen bij 4 °C, maximale stand eppendorfcentrifuge
- pellet drogen ($\pm$ 5 minuten in de excicator onder voortdurend vacuum of $\pm$ 30 minuten op tafel, eventueel deksel van het epje met gaatjes)
- resuspenderen in 250 μl 0.1 TE
- 10 μl RNase (5 μl 200 U/ml) toevoegen
- even centrifugeren en daarna met een blauwe pipetpunt op en neer pipeteren, zodat je zeker weer dat het pellet goed is opgelost
- 1 minuut bij hoogste stand in eppendorfcentrifuge bij 4 °C centrifugeren
- na 60 minuten 240 μl in nieuw epje pipeteren

Protocol DNA isolatie met CTAB

- Polycarbonaatfilter in 2 ml epje en in vloeibare stikstof dompelen
- met een disposable stampertje malen, opletten dat de filter niet ontdooit, lijkt dit wel te gebeuren dan met een leeg epje vloeibare stikstof in het epje met filter gieten (veiligheidsbril op!)
- na het malen epje met filter in vloeibare stikstof bewaren voor 'direkt' gebruik
- totaalvolume (iets meer dan nodig, per monster nodig 750 μl) CTAB in een blauwe dopbuis pipeteren 2 μl/ml β-mercapto-ethanol toevoegen (GIFTIG, Handschoenen aan !), dop erop en voorzichtig mengen
- blauwe dopbuis met inhoud minimaal 15 minuten in 60 °C waterbad voorverwarmen
- epjes met filters in droogbad van 60 °C zetten en 750 μl CTAB-extractiebuffer toevoegen
- 30 minuten in droogbad laten staan, af en toe vortexen
- 750 μl CIA toevoegen
- 10 minuten centrifugeren bij 4 °C, maximale stand eppendorfcentrifuge (NB: polycarbonaat filter lost hierin op)
- waterfase (bovenste fase) in nieuw epje (hierin zit DNA + in water oplosbare eiwitten)
- toevoegen 2/3 volume isopropanol ($\pm$ 0.5 ml, bind aan DNA (ook RNA) en slaat neer), mengen en 1 uur in de koelkast laten staan
- 30 minuten centrifugen bij 4 °C, maximale stand eppendorfcentrifuge
- afgieten en pellet wassen met 1 ml 80% ethanol (-20 °C), mengen, 15 minuten in de -20 °C
- 30 minuten centrifugen bij 4 °C, maximale stand eppendorfcentrifuge
- pellet drogen ($\pm$ 5 minuten in de excicator onder voortdurend vacuum of $\pm$ 30 minuten op tafel, eventueel deksel van het epje met gaatjes)
- pellet oplossen in 250 μl 0.1 TE
- 10 μl RNase (5 μl 200 U/ml) toevoegen
- even centrifugeren en daarna met een blauwe pipetpunt op en neer pipeteren, zodat je zeker weer dat het pellet goed is opgelost
- 1 minuut bij hoogste stand in eppendorfcentrifuge bij 4 °C centrifugeren
- na 60 minuten 240 μl in nieuw epje pipeteren

Protocol DNA isolatie met CTAB voor GF/F filters

- een pincet, om de filter vast te houden, en een mesje worden voor elke filter opnieuw in de ethanol gedoopt en afgevlamd.
- GF/F filter in bevroren toestand snijden in een steriele glazen petrischaal (handschoenen aantrekken).
- de filter kan vrij grof gesneden worden, stroken van ± 0.5 cm is genoeg.
- de gesneden filter in een 10ml blauwe dopbuis en alles gelijk weer in de -20 °C of in de vloeibare stikstof, voordat de filter werkelijk ontdooit.
- totaalvolume (iets meer dan nodig, per monster nodig 2.5 ml) CTAB in een blauwe dopbuis pipeteren 2 μl/ml β-mercapto-ethanol toevoegen (GIFTIG, Handschoenen aan !), dop erop en voorzichtig mengen
- blauwe dopbuis met inhoud minimaal 15 minuten in 60 °C waterbad voorverwarmen
- blauwe dopbuizen met filters in een waterbad van 60 °C zetten (in een houder van piepschuim laten drijven) en 2.5 ml CTAB-extractiebuffer toevoegen
- 30 minuten in waterbad laten staan, af en toe vortexen
- 2.5 ml CIA toevoegen
- 10 minuten centrifugeren bij 4 °C, maximale stand centrifuge
- na centrifugeren is er geen fase scheiding door teveel filtermateriaal
- met een glazen steriel pipet het filtermateriaal uit de blauwe dopbuis halen. De filter aan de rand van de dopbuid goed droogdrukken, zodat er nauwelijks vloeistof verloren gaat
- 10 minuten centrifugeren bij 4 °C, maximale stand centrifuge
- is de fasescheiding te laag en ligt deze nog tussen het filterprut dan 1 ml CIA toevoegen en nogmaals 10 minuten centrifugeren bij 4 °C, maximale stand centrifuge
- 2 keer 1.25 ml waterfase (bovenste fase, hierin zit DNA + in water oplosbare eiwitten) eraf pipeteren en elke 1.25 ml in een 2 ml epje (dan blijft in de blauwe dopbuis ± 0.5 ml over, maar vanwege de filterprut is het moeilijk om tot de scheiding de waterfase af te pipeteren)

het volgende geld in elk epje apart en dan hou je aan het einde 2 keer 240 μl over

- toevoegen 2/3 volume isopropanol (± 0.8 ml, bind aan DNA (ook RNA) en slaat neer), mengen en 1 uur in de koelkast laten staan
- 30 minuten centrifugen bij 4 °C, maximale stand eppendorfcentrifuge
- afgieten en pellet wassen met 1 ml 80% ethanol (-20 °C), mengen, 15 minuten in de -20 °C
- 30 minuten centrifugen bij 4 °C, maximale stand eppendorfcentrifuge
- pellet drogen (± 5 minuten in de excicator onder voortdurend vacuum of ± 30 minuten op tafel, eventueel deksel van het epje met gaatjes)
- pellet oplossen in 250 μl 0.1 TE
- 10 μl RNase (5 μl 200 U/ml) toevoegen
- even centrifugeren en daarna met een blauwe pipetpunt op en neer pipeteren, zodat je zeker weer dat het pellet goed is opgelost
- 1 minuut bij hoogste stand in eppendorfcentrifuge bij 4 °C centrifugeren
- na 60 minuten 240 μl in nieuw epje pipeteren

Protokol DNA analyse met behulp van PicoGreen® (Molecular probes) en fluorimeter (WALAC 1420 multilabel counter)

- bel Dolores (5331357, 5331313 of 5331315) om een afspraak te maken.

- **Methode ruwweg**: 10 μl monster (of voor de 1 μm filter 5 μl als je een hoge opbrengst verwacht) pipetteren in een zwarte microtray en dit met TE of 0,1 TE aanvullen tot 100 μl totaaloplossing; hieraan 100 μl PicoGreen® toevoegen, even mengen en doormeten maar op de fluorimeter
- de verwachte DNA concentratie moet liggen tussen de 10 -900 ng/ml. Als de concentratie nog totaal onbekend is, verschillende verdunningen doormeten (zie onder)

N.B. Gebruik steriel cupjes en pipetpuntjes. Na gebruik microtray leegmaken met de door Peter speciaal ontworpen microtrayvacuümzuiger, plaat heel goed spoelen met kraanwater, demi en MilliQ. Microtray niet autoclaveren maar laten drogen ondersteboven op filtreerpapier

Werkwijze

- prepareer een DNA ijklijn in TE. Neem hiervoor als uitgangsoplossing bijvoorbeeld 10 μg/ml DNA oplossing uit de koelkast. Verdun deze oplossing 10 keer door 500 μl DNA oplossing en 4.5 ml TE te mengen in een steriele plastic buis. Dit is genoeg voor een ijklijn. Neem 10 steriele cupjes en pipetteer hierin volgens het onderstaande schema (μl's):

DNA oplossing	TE	Concentratie (ng/ml)
0	1000	0
10	990	10
20	980	20
30	970	30
60	940	60
100	900	100
200	800	200
300	700	300
600	400	600
900	100	900

- pipetteer hiervan 100 μl's in microtraywells (de rest van de ijklijk kun je invriezen voor later gebruik)
- prepareren monsters. Ontdooi monsters en verdun afhankelijk van de verwachte concentratie (bijvoorbeeld 20 μl extract en 80 μl TE in well = 5 x verdund, of 10 μl monster en 90 μl TE geeft 10 x verdund). N.B. Extracten goed vortexen voordat je submonster neemt.
- maak de PicoGreen® oplossing door 1:200 te verdunnen met TE in een blauwe

dopbuis waar alluminiumfolie omheen is gewikkeld, want de oplossing moet in het DONKER bewaard worden!!! (bijvoorbeeld 50 μl PicoGreen® en 10 ml TE is genoeg voor 90 monsters en een ijklijn, dus een compleet gevulde tray).

- neem de PicoGreen® oplossing mee en een geschikte 100 μl pipet. Voeg, als het apparaat is ingesteld de PicoGreen® toe, ment en plaats de tray in het apparaat (alles snel in gedimd licht). Scan de tray met de fluorimeter.

Er is een protocol aangemaakt voor de DNA metingen op basis van excitatie bij 485 nm en emissie bij 535 nm. Dit protocol is makkelijk op te roepen in de software.

Protocol instelling fluorimeter (WALAC 1420 multilabel counter)

Protocol name	DNA
Protocol number	N/A
Name of the plate type	Generic 8 x 12 size plate
Number of repeats	1
Delay between repeats	120
Measurment height	Default
Name of the label	FluoresceinV
Label technology	Prompt fluorometry
CW-lamp filter name	F485 (Fluorescein)
CW-lamp filter slot	A5
Emission filter name	F535 (Fluorescein)
Emission filter slot	A5
Measurement time	1.0 s
Emission aperture	Normal
CW-lamp energy	22512

Protocol Immunoslotblot

Monsters: van de 0.2 μm filter werd er 0.5 μg DNA opgebracht, van de 1 μm filter en de GF/F filter 2 μg DNA. Als er minder DNA was geïsoleerd dan werd alles opgebracht.
Biodosismetermonsters: 100 μl of minder afhankelijk van de verwachte DNA schade, er kan ook een reeks van verdunningen worden opgebracht.
IJklijn van referentie DNA (zie protocul PBB verdunningen)

Algemeen: alle epjes, puntjes, buffers, ovenschalen etc. DNase- en AP-vrij (autoclaveren of in de stoof steriliseren)

- IJs halen en stoof aanzetten op 80 °C
- van elk monster iets meer dan de benodigde hoeveelheid in 1.5 ml epje
- glazen schaal met ruime hoeveelheid water aan de kook brengen
- de epjes ondertussen in een houder van piepschuim zetten
- de houder in het kokende water plaatsen
- DNA enkelstrengs maken door 10 minuten te koken en hierna de houder direkt op ijs te zetten
- Tussendoor de filter (merken door hoekje te verwijderen, Nytran® 0.45 neutrale nylontransfermembraan, Schleicher en Schüll) natmaken in SMQ (steriel MQ), na 5 minuten vervolgens in PBS.
- blotapparaat van Schleicher en Schüll (SRC 96 D minifold) op vacuümpomp aansluiten, vacuüm aan en op maximale stand
- blotpapier (GB-003) natmaken in SMQ en PBS en op het blotapparaat leggen
- filter opbrengen en zorgen dat er geen luchtbellen onder zit
- blotapparaat in elkaar zetten en klemmen kruislings vastmaken
- de benodigde hoeveelheid DNA opbrengen
- als alle DNA monsters zijn opgebracht en doorgelopen, naspoelen met 100 μl PBS wat met een multipipet wordt opgebracht (PBS in steriele schaal). Langzaam pipeteren en als dit is doorgelopen nogmaals herhalen.
- filter uit het blotapparaat halen en tussen filtreerpapier 1-2 uur bakken bij 80 °C

schoonmaken blotapparaat: spoelen met kraanwater, daarna met 2 M HCl snel met demi afspoelen, daarna met MQ afspoelen, laten drogen.

- filter pre-incuberen in een steriele ovenschaal met 5% melkpoeder-PBS-T (2.5 g melkpoeder voor 50 ml PBS + 0.1% Tween 20 (1 mg/l))
- 30 minuten bij kamertemperatuur zachtjes laten schudden op het schudapparaat (ervoor zorgen dat de filter constant nat blijft!)
- filter 1 x in PBS-T omspoelen (boven de wasbak)
- hierna 3 x 10 minuten wassen met PBS-T, bij kamertemperatuur zachtjes laten schudden, in de laatste wasstap van ovenschaal verwisselen
- eerste antilichaam incubatie, 1/4000 H3 antilichaam (L. Roza, TNO, Zeist), in 0.5% melkpoeder-PBS-T (0.25 g melkpoeder voor 50 ml PBS-T, hier 25 ml nodig rest voor volgende melkpoederstap), de ovenschaal met parafilm overdekken en onder voortdurend schudden laten overnachten in 4 °C kamer (of 2 uur bij kamertemperatuur)

- 3 x 15 minuten wassen met PBS-T, bij kamertemperatuur zachtjes laten schudden (in deze stap van ovenschaal verwisselen)
- tweede antilichaam incubatie, 1/5000 (5 μl) AP Mouse immunoglobins DO 314 DAKO (konijn-antimuis-Alkalische-Phosphatase antilicaam, in de rest, 25 ml, van 0.5% melkpoeder-PBS-T, de ovenschaal met parafilm overdekken en onder voortdurend schudden 2 uur bij kamertemperatuur laten staan
- 4 x 15 minuten wassen met PBS-T, bij kamertemperatuur zachtjes laten schudden (na 1 x wassen van ovenschaal wisselen)
- ondertussen alles voor de donkere kamer klaarmaken: Lumiphos (2 ml Lumi-Phos® plus (GibcoBRL) in 15 ml buffer C in een blauwe dopbuis met aluminium-folie eromheen) en klaarleggen
- filter 1 x spoelen in een schone ovenschaal met buffer C en daarna 1-5 minuten in buffer C bij kamertemperatuur laten staan en met alles naar de donkere kamer
- in gedimd licht: filter in een nieuwe ovenschaal en het Lumiphos toevoegen, hierin $\pm$ 1 minuut laten liggen
- filter eruithalen en uit laten lekken, daarna tussen sheets leggen en dichtsealen (maximaal 3 x op seal-apparaat drukken per kant)
- in dokalicht, of in het donker, de filter op de lichtgevoelige film (KODAK X-AR 5) leggen en 2-60 minuten belichten, meestal met 30 minuten begonnen, en naarmate de tijd van toevoeging van Luminphos langer is verstreken des te korter wordt de belichtingstijd
- film 3-5 minuten ontwikkelen, daarna in het stopbad en dan 5 minuten in de fixeer, goed spoelen, naspoelen met DEMI en drogen
- film scannen in Photo Adobeshop en quantificatie met ImageQuant, waarin je de van de scan een negatief maakt, hierover leg je een grid van rondjes iets kleiner dan de monsterpunten. Na het maken van een "volume report" kunnen de grijstinten worden geanalyseerd. De resultaten kunnen in Excell worden ingelezen en verder worden doorberekend.

Protocol PBB verdunningen

DNA oplossing van 10 μg kaal DNA (kalfsthymus) per ml voor een bepaalde tijd aan een kale UV-B lamp blootgesteld, bv. 10 μg/ml 10 minuten blootgesteld. Deze oplossing 1000 keer verdunnen.

gebruikte ijklijn :

concentratie DNA (ng/ml)	DNA toevoegen (μl)	TE toevoegen (μl)
10.00	1000	-
8.75	875	125
7.50	750	250
6.25	625	375
5.00	500	500
3.75	375	625
2.50	250	750
1.25	125	875
0.00	-	1000

Meestal werd vanaf 5 nl/ml opgebracht en werd rest van de lijn nogmaals 10 x verdunt zodat de volgende concentraties (ng/ml) ook konden worden opgebracht: 1.0, 0.875, 0.750, 0.625, 0.500, 0.375, 0.250, 0.125.

Protocol HH-DNA
gebruik van HH-DNA voor vaststellen DNA schade (absoluut)

EEN OPMERKING VOORAF. We hebben een gelimiteerde portie van dit DNA van TNO gekregen, waardoor we nu 20 x onze eigen bestraalde DNA (PBB-DNA) kunnen calibreren volgens onderstaand schema. Een ijklijn doormeten volgens onderstaand voorstel is lang niet altijd nodig: wanneer we enigzins de indruk hebben van de verhouding tussen schade in HH-DNA en PBB-DNA, kunnen we volstaan met zo nu en dan een calibratie tussendoor (met een nog nader te bepalen hoeveelheid HH-DNA). De rest van de voorraad kunnen we bewaren voor het calibreren van een volgende eigengemaakte ijkvoorraad.

- in de -80 °C diepvries zitten porties van 1.18 μg ingevroren in kleine epjes (in 50 μl)
- ontdooi de inhoud van een epje en voeg 950 μl Te toe. Je hebt nu een concentratie van 1.18 μl/ml
- volgens opgave TNO maximaal 200 ng opbrengen. Voorgestelde ijklijn is dan: 5, 10, 25, 50, 100 en 200 ng (steeds iets meer zie onder)
- van de ijklijn worden hoeveelheden van 200 μl opgebracht (anders kun je maximaal maar 100 ng opbrengen). Pippetteer nu de ijklijn volgens schema:

HH-DNA (μl)	TE (μl)
5	195
10	190
20	180
50	150
100	100
200	0

Breng hiervan 180 μl op het blotapparaat op (10% gaat ongeveer verloren bij het opkoken en vervolg blotschema.

BIJLAGE: Gebruikte buffers, stockoplossingen (etc.)

Buffer C (250 ml): 25 ml 1 M stock Tris-HCl pH 9.5
25 ml 0.5 M stock $MgCl_2$
6.25 4 M stock NaCl
aanvullen met SMQ tot 250 ml

CIA 24:1 (chloroform-isoamylalcohol): 96 ml chloroform
4 ml isoamylalcohol

CTAB (cetyl-trimethyl-ammonium-bromide):
2 % (2 g) CTAB
1.4 M NaCl (35 ml 4M stock)
20 mM EDTA (4 ml 0.5 M stock)
100 mM Tris-HCl pH 8.0 (10 ml 1 M stock)

0.5 M stock EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid):
186.1 g Na_2EDTA . 2 H_2O oplossen in 700 ml H_2O
toevoegen van 10 M NaOH ($\pm$ 50 ml) tot een pH 8.0
Voeg H_2O toe tot 1 liter

EtOH 80%: 80 ml 100% EtOH + 20 ml H_2O

1 M stock KCl: 74.6 g KCl met H_2O aanvullen tot 1 liter

3 M NaAc pH 5.0: 40 g NaAc oplossen in H_2O tot 0.1 liter
LET OP in Maniatis deel 3 gaat men ervan uit dat je NaAc . 3 H_2O gebruikt, op BC watervrij NaAc aanwezig, dus lager molekuulgewicht. Wanneer je hiervan teveel toevoegt lost het niet op (nl. overmmaat)

4 M stock NaCl; 117 g NaCl oplossen in 0.5 liter H_2O

1 M $MgCl_2$: 20.3 g $MgCl_2$. 6 H_2O
H_2O aanvullen tot 100 ml

Phosphate buffered saline (PBS), 10 x stock oplossing, 1 liter:
80 g NaCl
2 g KCl
11.5 g Na_2HPO_4 . 7 H_2O
(of 6.1 g Na_2HPO_4 of 15.4 g Na_2HPO_4 . 12 H_2O)
2 g KH_2PO_4

pH stellen op pH 7.3 m.b.v HCl of NaOH oplossing, een oplossing van 25% HCL of 10 M NaOH is erg goed voor de 'grove' afstelling, verdunde oplossingen daarvan gebruiken voor de 'fijne' afstelling

PBS-T: PBS + 0.1 % Tween 20

10 % SDS (sodium dodecyl sulfate):
10 g electroforesis grade SDS oplossen in 90 ml H_2O
verwarmen tot 68 °C om niet oplosbaar te voorkomen
pH tot 7.2 met HCl oplossing
aanvullen met H_2O tot 100 ml

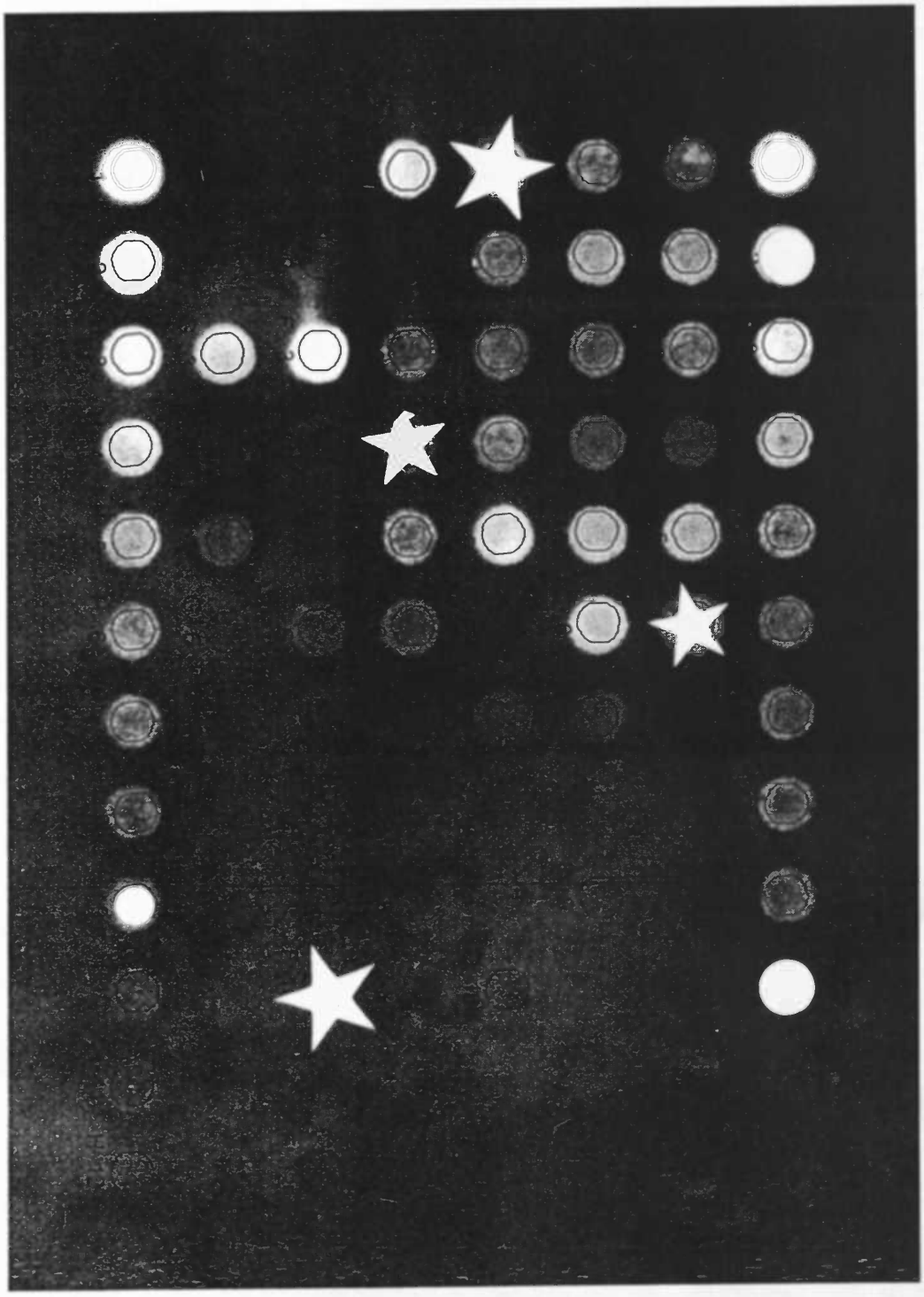
STE buffer:
1 ml 1 M stock Tris-HCl
200 μl 0.5 M stock EDTA
2.5 ml 4 M stock NaCl
aanvullen met H_2O tot 100 ml

STE/SDS:
0.5 ml 1 M stock Tris-HCl
100 μl 0.5 M stock EDTA
1.25 ml 4 M stock NaCl
5 ml 10% SDS

TE buffer, pH 7.4, 7.5 of 8.0:
10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 7.5 of 8.0
1 mM EDTA, pH 8.0

1 M TE buffer:
1 ml 1 M stock Tris-HCl
200 μl 0.5 M stock EDTA

0.1 M TE buffer:
0.1 ml 1 M Tris-HCl
20 μl 0.5 M stock EDTA

1 M stock Tris-HCl pH 8.0: 60.55 g Tris-HCl oplossen in 0.5 liter

1 M Tris-Cl:
121 g Tris base oplossen in 800 ml H_2O
met HCl op de gewenste pH brengen
mengen en H_2O toevoegen tot 1 liter