

## University of Groningen

### Sun-dazed to the core

Boelen, Peter

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2002

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Boelen, P. (2002). *Sun-dazed to the core: Accumulation of DNA damage in (sub) tropical picoplankton assemblages exposed to solar ultraviolet radiation*. s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## SAMENVATTING

Het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven, heeft een bijdrage geleverd aan de kennis over de invloed van schadelijke componenten van het zonlicht op de kleinste organismen in tropische en subtropische zeeën en oceanen.

Oceanen beslaan ruim tweederde van het aardoppervlak. Aan de basis van vrijwel al het leven in de oceanen staan kleine vrijzwevende eencellige algen, oftewel het fytoplankton. Algen maken gebruik van kooldioxide, andere anorganische voedingsstoffen en zonlicht om celmateriaal te produceren. Het fytoplankton wordt begraaasd door zoöplankton en vormt zo het begin van een voedselketen naar steeds grotere dieren. Ongeveer de helft van het organisch materiaal dat door het fytoplankton wordt geproduceerd, wordt echter direct hergebruikt. Opgeloste organische moleculen lekken uit het fytoplankton of komen vrij als het fytoplankton afsterft. Bij de afbraak van dit organisch materiaal spelen mariene bacteriën, het bacterioplankton, een belangrijke rol.

Tropische en subtropische oceanen, tussen 30° noorderbreedte en 30° zuiderbreedte, zijn over het algemeen zeer helder. De biomassa aan algen in dit soort wateren is laag omdat er weinig anorganische voedingsstoffen in zitten. In zo'n omgeving moet een organisme klein zijn om te kunnen concurreren met andere organismen. Bij kleine cellen is de verhouding tussen de oppervlakte van de cel en de inhoud van de cel gunstig waardoor voedingsstoffen vlugger opgenomen kunnen worden. Het fytoplankton en het bacterioplankton in deze voedselarme oceanen zijn dan ook zeer klein. Het overgrote deel van het plankton bestaat uit organismen die kleiner zijn dan 2 µm in doorsnede; het picoplankton.

Ofschoon kleine cellen het voordeel hebben dat ze makkelijk voedingsstoffen kunnen opnemen zijn ze, omdat ze zo klein zijn, extra gevoelig voor de schadelijke componenten van het zonlicht. De intensiteit van het zonlicht is in de tropen en subtropen het gehele jaar hoog. Daar komt bij dat zonnestraling tot grote diepte kan doordringen in de heldere (sub)tropische oceanen. Een zeer schadelijke component van het zonlicht is ultraviolet-B-straling (UVB-straling). UVB-straling bestaat uit de kortste golflengtes van het zonlicht die nog tot het aardoppervlak kunnen doordringen, namelijk de golflengtes tussen de 280 en 315 nanometer. Alhoewel deze golflengtes maar een klein deel uitmaken van het totale zonnenspectrum zijn ze toch energierijk genoeg om grote schade te kunnen aanrichten aan biologische moleculen zoals eiwitten of DNA.

DNA is de drager van de genetische code en daarom onmisbaar voor ieder levend wezen. UVB-straling wordt sterk geabsorbeerd door DNA. Dit kan leiden tot fotochemische reacties met als gevolg het ontstaan van DNA-fotoproducten. Deze fotoproducten, zoals cyclobutaan pyrimidine dimeren (CPDs), blokkeren de enzymen

die van belang zijn bij de transcriptie en de replicatie van het DNA. Dit kan leiden tot mutaties, afname in groeisnelheid of zelfs celsterfte. Over het algemeen zijn cellen in staat deze schade aan het DNA te repareren. De twee belangrijkste reparatiemechanismen zijn 'nucleotide excisie reparatie' en fotoreactivering. Fotoreactivering is een proces waarbij het enzym fotolyase met behulp van zonlicht de beschadiging van het DNA ongedaan maakt. Deze vorm van DNA reparatie is afhankelijk van de hoeveelheid zonlicht die kan doordringen in het water. Omdat 'nucleotide excisie reparatie' in tegenstelling tot fotoreactivering ook in het donker kan plaatsvinden wordt deze vorm van herstel ook wel donkerreparatie genoemd.

Bij de start van dit promotieonderzoek, in 1995, was er nauwelijks iets bekend over de mogelijke effecten van natuurlijke UVB-straling op het DNA van marien tropisch picoplankton. Of er in zee ophoping van UVB-geïnduceerde DNA-schade plaatsvond, of dat bijvoorbeeld DNA-herstelmechanismen in staat waren dit tegen te gaan was nog nooit onderzocht. Over het algemeen werd aangenomen dat tropisch plankton goed aangepast zou zijn aan de hoge intensiteit van UVB-straling in de tropen.

In dit proefschrift worden verscheidene veldstudies beschreven waarin de effecten van natuurlijke UVB-straling op tropisch en subtropisch picoplankton zijn onderzocht. De belangrijkste vraagstelling was of UVB-straling schade kon veroorzaken in een belangrijk organisch molecuul dat aanwezig is in alle levende organismen, dus ook in het mariene picoplankton: het DNA. De volgende hypothesen werden gedefinieerd aan het begin van deze studie.

1. In zee wordt het DNA van marien tropisch picoplankton beschadigd door UVB-straling.
2. Deze schade wordt voornamelijk gerepareerd door middel van fotoreactivering.
3. Groter plankton is beter bestand tegen UVB-straling dan kleiner plankton.
4. Tropisch plankton is beter bestand tegen UVB-straling dan plankton van hogere breedtegraden.

Om deze hypothesen te kunnen toetsen werd allereerst informatie verzameld hoe ver biologisch effectieve UVB-straling, d.w.z. UVB-straling die in staat is om het DNA te beschadigen, kan doordringen in (sub)tropische wateren. Hiervoor werd een gevoelige DNA-dosimeter ontwikkeld die werd getest gedurende een vaartocht op de Atlantische Oceaan en in verschillende watertypes voor de kust van Curaçao (hoofdstuk 2). Kleine buisjes met een DNA-oplossing werden voor een bepaalde periode opgehangen op verschillende dieptes. Vervolgens werd de hoeveelheid UVB-geïnduceerde DNA-schade, gemeten als de hoeveelheid CPDs, in deze DNA-oplossing bepaald. De hoeveelheid geïnduceerde DNA-schade werd vergeleken met de hoeveelheid biologisch effectieve UVB-straling waaraan de dosimeterbuisjes waren blootgesteld. Deze biologisch effectieve doses werden berekend aan de hand van lichtmetingen met behulp van een spectroradiometer met onderwatersensor. De DNA-dosimeter bleek een betrouwbare en makkelijke manier om de hoeveelheid

schadelijke UV  
biologisch effe  
water. Dit is di  
te kunnen bein

Op dezelf  
het bacterio- e  
dieptes zeewa  
filters gebruikt  
diameter tusse  
diameter tusse  
schade gevond  
schade werd  
Oceaan. Dit or

Om een u  
het nodig om  
veldmonsters  
waterkolom al  
dit transport v  
van het zonli  
DNA-schade  
lichtomstandi  
blootgesteld  
verzameld v  
lichtregimes.  
afgeschermd.  
DNA-synthes  
bepaald wor  
zonnenspectru  
DNA-synthes

In hoof  
voor UVB-s  
gevoeligheid  
werd uitged  
geïnduceerd  
afgeschermd  
fracties we  
verhouding  
ophoopt gec  
Ook 'in het  
van het pla  
picoplankto  
experiment

## Samenvatting

schadelijke UVB-straling in mariene wateren te meten. De resultaten laten zien dat biologisch effectieve UVB-straling tot enkele tientallen meters kan doordringen in het water. Dit is diep genoeg om mariene organismen in (sub)tropische zeeën en oceanen te kunnen beïnvloeden.

Op dezelfde locaties is ook de hoeveelheid UVB-geïnduceerde DNA-schade in het bacterio- en fytoplankton bepaald (hoofdstuk 3). Hiervoor werd op verschillende dieptes zeewater verzameld dat vervolgens werd gefiltreerd. Er werden meerdere filters gebruikt zodat een onderscheid kon worden gemaakt tussen plankton met een diameter tussen de 0,2  $\mu\text{m}$  en 1  $\mu\text{m}$  (de kleine fractie) en het plankton met een diameter tussen 1  $\mu\text{m}$  en 10  $\mu\text{m}$  (de grote fractie). Gemiddeld werd er meer DNA-schade gevonden in de kleine fractie dan in de grote fractie. De grootste hoeveelheid schade werd gemeten in een kleine fractie afkomstig uit de centrale Atlantische Oceaan. Dit ondanks het feit dat op andere locaties meer UVB-straling gemeten werd.

Om een uitspraak te kunnen doen hoe gevoelig plankton voor UVB-straling is, is het nodig om te weten aan hoeveel zonlicht het plankton heeft blootgestaan. Dit is bij veldmonsters moeilijk te bepalen omdat het plankton op en neer beweegt in de waterkolom als het gevolg van door de wind veroorzaakte verticale menging. Tijdens dit transport verandert niet alleen de hoeveelheid maar ook de spectrale samenstelling van het zonlicht waaraan het plankton wordt blootgesteld. Om de ophoping van DNA-schade in picoplankton te kunnen volgen onder goed gedefinieerde lichtomstandigheden werden veldmonsters in transparante zakken aan het zonlicht blootgesteld (hoofdstuk 4). Veldpopulaties van mariene bacteriën die waren verzameld voor de kust van Curaçao, werden blootgesteld aan verschillende lichtregimes. Door middel van filters werd een deel van het zonnenspectrum afgeschermd. Het effect van verschillende golflengtes op de snelheid van eiwit- en DNA-synthese en op de inductie van DNA-schade (CPDs) kon op deze manier bepaald worden. De resultaten toonden aan dat alleen het UVB-gedeelte van het zonnenspectrum verantwoordelijk is voor het optreden van DNA-schade. Eiwit en DNA-synthese werden geremd door alle delen van het zonnenspectrum.

In hoofdstuk 5 wordt een reeks experimenten beschreven waarin de gevoeligheid voor UVB-straling van tropisch bacterio- en fytoplankton is onderzocht. De UVB-gevoeligheid van twee fracties (0,2 tot 0,8  $\mu\text{m}$  en 0,8 tot 10  $\mu\text{m}$ ) van het plankton werd uitgedrukt als de verhouding tussen de hoeveelheid DNA-schade die werd geïnduceerd in het plankton en de hoeveelheid schade geïnduceerd in niet afgeschermd en ongerepareerd 'kaal' DNA. Een verschil tussen de twee planktonfracties werd niet gevonden. In beide fracties schommelde de 'DNA-schade' verhouding rond de 0,32. Uit analyse van veldmonsters bleek dat DNA-schade zich ophoopt gedurende de dag en aan het eind van de middag of 's nachts weer afneemt. Ook 'in het veld' werd geen verschil gevonden tussen de kleine en de grotere fractie van het plankton. Om te onderzoeken of bij het herstel van DNA-schade in tropisch picoplankton fotoreactivering wellicht een rol speelt, zijn 'transplantatie' experimenten uitgevoerd. Hierbij werden veldmonsters blootgesteld aan het volle

zonlicht en vervolgens verplaatst naar 10 meter diepte. Op deze diepte is de intensiteit van de UVB-straling laag maar zijn de golflengtes die van belang zijn bij fotoreactivering nog steeds aanwezig. Herstel van DNA-schade trad niet op. Dit houdt in dat ofwel in tropisch picoplankton fotoreactivering niet plaatsvindt of dat de herstelmechanismen van het plankton beschadigd waren door de hoge lichtintensiteit in de zakken.

Deze laatste mogelijkheid werd ondersteund door experimenten waarbij natuurlijke populaties van bacterio- en fytoplankton, afkomstig uit de Golf van Aqaba (Rode Zee), gedurende twee achtereenvolgende dagen werden blootgesteld aan zonlicht (hoofdstuk 6). Terwijl de dagelijkse hoeveelheid UVB-straling niet veranderde, was de toename van DNA-schade in het plankton hoger op de tweede dag dan op de eerste dag. Blijkbaar waren de DNA-herstelcapaciteiten van het plankton verminderd gedurende het experiment. De toename en afname van DNA-schade *in situ* werd gevolgd door op achtereenvolgende dagen veldmonsters te analyseren. De hoeveelheid CPDs in het plankton nam toe gedurende de dag. Dit betekent dat UVB-straling een stressfactor is voor het plankton in de Golf van Aqaba. Hoewel de hoeveelheid DNA-schade afnam in het donker, bleek dat er aan het eind van nacht nog steeds wat restschade aanwezig was. Dit suggereert dat donkerreparatieprocessen niet in staat waren alle DNA-schade te verwijderen. Een andere mogelijkheid is dat de DNA-schade niet gelijk verdeeld was over de populatie, maar dat een groot deel van de schade aanwezig was in een aantal zwaar beschadigde cellen die daardoor niet meer in staat waren deze schade te repareren. Er werd geen verschil gevonden tussen de kleine (0,2  $\mu\text{m}$  tot 0,8  $\mu\text{m}$ ) en de grote (0,8  $\mu\text{m}$  tot 10  $\mu\text{m}$ ) fractie van het plankton. Dit was echter niet het geval bij de experimenten waarbij het plankton gedurende twee achtereenvolgende dagen in zakken werd blootgesteld aan het zonlicht. In de kleine fractie van het plankton werd meer DNA-schade geïnduceerd dan in de grote fractie. Een verklaring hiervoor was dat de soortensamenstelling van het plankton in de zakken niet hetzelfde was als in het veld. Na één nacht was de hoeveelheid bacteriën en cyanobacteriën in de zakken fors toegenomen. Deze resultaten toonden aan dat een verandering in soortensamenstelling of in lichtcondities kan leiden tot een verandering in UVB-gevoeligheid van de picoplanktongemeenschap.

Om de vraag te kunnen beantwoorden of plankton uit tropische gebieden beter bestand is tegen UVB-straling dan plankton van hogere breedtegraden, zijn de gegevens die verzameld waren in de tropen en subtropen vergeleken met gegevens uit gematigde en Antarctische gebieden (hoofdstuk 7). De gevoeligheid van het plankton werd berekend door de hoeveelheid CPDs die zich in de loop van de dag in het plankton ophoopt te delen door de hoeveelheid UVB-geïnduceerde DNA-schade in een DNA-dosimeter. Er werd geen verband gevonden tussen breedtegraad en UVB-gevoeligheid. Niet alleen klein marien plankton uit Antarctische en gematigde gebieden maar ook tropisch plankton bleek gevoeliger voor UVB-straling dan plankton uit subtropische gebieden. Verder werd het fytoplankton uit de gematigde en Antarctische gebieden gedomineerd door grote kiezelwieren (diatomeeën) die relatief

ongevoelig  
dat niet al  
voor UVB  
adaptatiep

## CONCLU

1. Uit h  
geïnd  
picop  
meng  
Deze  
remm
2. De ex  
het  
picop  
zijn,
3. Mari  
overg  
wate  
gevo  
fract  
gevo  
fytop  
gevo
4. Er k  
UVB  
van  
UVB  
gem  
UVB  
UVB-str  
fytoplan  
sterk ka  
gevonde  
geconcl  
aardopp  
gevolg

ongevoelig waren voor UVB-geïnduceerde DNA-schade. De resultaten toonden aan dat niet alleen de breedtegraad bepalend is voor de gevoeligheid van het plankton voor UVB-straling. Andere factoren zoals celgrootte, tekort aan voedingsstoffen of adaptatieprocessen kunnen niet buiten beschouwing worden gelaten.

**CONCLUSIES:**

1. Uit het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven, blijkt dat UVB-geïnduceerde DNA-schade een algemeen fenomeen is in marien (sub)tropisch picoplankton. Dit houdt in dat, ook al is plankton onderhevig aan verticale menging, natuurlijke UVB-straling een stressfactor is voor deze organismen. Deze vorm van stress kan de groeisnelheid verminderen als het gevolg van de remming van eiwit- of DNA-synthese.
2. De experimenten toonden aan dat donkerreparatie een belangrijke rol speelt bij het verwijderen van UVB-geïnduceerde DNA-schade in (sub)tropisch picoplankton. Omdat gedurende de dag DNA-reparatiesnelheden relatief laag zijn, lijkt fotoreactivering van minder belang te zijn.
3. Mariene bacteriën en klein fytoplankton (< 1 µm in diameter) vormen samen de overgrote meerderheid van alle organismen in voedselarme (sub)tropische wateren. In het algemeen werden geen verschillen gevonden in UVB-gevoeligheid tussen verschillende groottefracties van deze kleine organismen. In fracties groter dan 1 µm werd echter minder UVB-geïnduceerde DNA-schade gevonden dan in kleinere fracties. Dit houdt in dat groter (eukaryotisch) fytoplankton, alhoewel nauwelijks aanwezig in voedselarme wateren, minder gevoelig is voor UVB-geïnduceerde DNA-schade.
4. Er kon niet worden aangetoond dat tropisch picoplankton beter bestand is tegen UVB-straling dan plankton van hogere breedtegraden. Andere factoren bleken van groter belang dan de breedtegraad. Tropisch plankton was gevoeliger voor UVB-straling dan subtropisch plankton. Verder bleek het fytoplankton in gematigde en Antarctische gebieden gedomineerd te worden door grote, relatief UVB-resistente, diatomeeën.

UVB-straling is een belangrijke fysische parameter die het mariene bacterio- en fytoplankton in de bovenste laag van tropische en subtropische zeeën en oceanen sterk kan beïnvloeden. Verschillen in UVB-gevoeligheid van het plankton werden gevonden tussen verschillende groottefracties, locaties en seizoenen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat veranderingen in de hoeveelheid UVB-straling die het aardoppervlak bereikt of veranderingen in de helderheid van het water, b.v. als het gevolg van eutrofiëring, van invloed zullen zijn op mariene voedselketens.