

L. W. G. Taylor

BEPALING VAN DE ADENYLATE ENERGY CHARGE VAN
DAPHNIA MAGNA
EN DE INVLOED VAN EEN TOXISCHE STOF HIEROP

september1984 - april1985

cor roos

Universiteit van Amsterdam
Vakgroep Aquatische Ecologie
in het kader van een extra
bijvak ecotoxicologie
onder verantwoording van
prof.dr. J. Ringelberg

Rijksinstituut voor
Natuurbeheer
Leersum
Afdeling Hydrobiologie
projectleider
dr. K. Kersting

1985

Overneming van gegevens is alleen
toegestaan na overleg met de projectleider

Rijksinstituut voor Natuurbeheer
Leersum

Inhoudsopgave:

p.	ii	samenvatting
p.	iii	voorwoord
p.	1	I. inleiding
p.	2	I.1. bioluminescentie
p.	3	I.2. aec-bepaling
p.	4	I.3. daphnia magna in toxiciteitsproeven
p.	5	I.4. dichlobenil
p.	5	I.5. doel van het onderzoek
p.	6	II. materiaal en methoden
p.	6	II.1. het kweken van daphnia magna
p.	6	II.2. omschrijving van de proeven
p.	7	II.3. extractie van de adenosines
p.	8	II.4. aec-bepaling
p.	9	II.5. chemicaliën
p.	10	II.6. bepaling eindconcentratie dichlobenil
p.	11	III. resultaten en discussie
p.	11	III.1. atp-bepaling
p.	11	III.2. adp en amp
p.	11	III.3. extracties
p.	12	III.4. de incubaties
p.	16	III.5. dichlobenil-concentraties
p.	18	III.6. de aec-waarden
p.	23	IV. conclusies en aanbevelingen
p.	24	V. literatuur

Samenvatting

In dit onderzoek werd getracht na bepaling van de adenylate energy charge (AEC) voor de cladoceer *Daphnia magna*, de invloed van toxische stoffen hierop te bepalen.

De gevonden AEC-waarden bleken sterk afhankelijk van de gevolgde methode. De hoogste waarden werden gevonden wanneer de proefdieren werden gedood in hete Tris-acetaat EDTA buffer. Tevens werden de adenosines in deze vloeistof het best geëxtraheerd.

De gebruikte enzymen voor de omzettingsreacties van AMP en ADP (de concentraties van deze adenosines werden als ATP gemeten) spelen tevens een rol.

Met behulp van de hier ontwikkelde methode bleek de AEC voor niet-gestressde *Daphnia magna* rond de 0.70 uit te komen.

Bij langdurige incubaties van *D.magna* met 0, 1, 3 en 10 ppm dichlobenil (2,6-dichloorbenzonitril), een herbicide, bleek dat een belasting van 10 ppm lethaal was binnen 7 dagen. Bij 24 uurs incubaties zijn de AEC-waarden bij 0 ppm belasting bijna overal hoger dan bij een 1-3 ppm dichlobenil belasting. Bij langdurige incubaties vond bij 1-3 ppm dichlobenil belasting geen verandering in de AEC-waarde plaats.

Hoewel nader onderzoek nodig is, lijkt het goed mogelijk m.b.v. de hier ontwikkelde methode de invloed van zowel toxische- als door andere oorzaken geïnduceerde stress te bepalen, vooralsnog onder geconditioneerde laboratorium omstandigheden.

Voorwoord

Dit onderzoek is het laatste onderdeel voor mijn afstuderen. Omdat ik behoefte had aan toxicologische kennis naast die van de aquatische ecologie en bestuurskunde kwam ik terecht bij dr. Kees Kersting. Hij bleek een zeer inspirerende begeleider te zijn. Mede hierdoor heb ik me met veel enthousiasme gestort op deze stage. Hoewel ik in het verleden wel een voorkeur dacht te hebben voor meer toegepast onderzoek heeft nu zeker het experimentele onderzoek ook mijn interesse.

Ik hoop van harte dat ik de kans krijg na mijn studie verder te kunnen gaan door een beroep in de ecologisch-toxicologisch- (bestuurlijke?) richting.

Voor hun begeleiding wil ik van harte bedanken dr.K.Kersting en prof.dr.J.Ringelberg. Verder Geeske Admiraal (Rijksinstituut voor Natuurbeheer te Leersum) voor de tips en het incuberen van Daphnia's ; Elze de Ruiter (R.I.N.Arnhem) voor de dichlo-benil bepalingen ; Koen Rooyackers voor zijn vele tips ; de Vakgroep Aquatische Ecologie U.v.A. ; de Afdeling Hydrobiologie van het R.I.N. Leersum ; de Afdeling Bodemecologie (dr. Peter Doelman) van het R.I.N.Arnhem voor het beschikbaar stellen van de luminometer.

-Amsterdam, 14 maart 1985-

I. Inleiding

Adenosine-tri-fosfaat (ATP) wordt in alle cellen gebruikt bij energetisch metabole processen. Het is de universele energiedrager. De energie ligt opgeslagen in de fosfor-esterbindingen, zoals aangegeven in de onderstaande figuur.

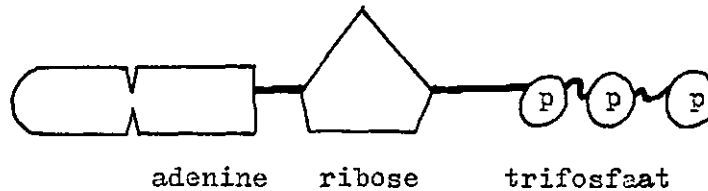


fig.1 versimpelde structuur van ATP met energierijke bindingen

ATP kan overgaan in minder energierijke verbindingen: adenosine-difosfaat (ADP) en adenosine-monofosfaat (AMP). Hierbij komt energie vrij.

ATP is wel gezien als maat voor biomassa (o.a. Holm-Hansen, 1969). Dood organisch materiaal zou geen ATP bevatten. Tevens wordt ATP gezien als maat voor metabolische activiteit (o.a. Patterson et al, 1972). Een hoge ATP concentratie zou duiden op een hoge metabolische activiteit. Voor laboratoriumcultures van bacteriën is dit echter niet gelukt om aan te tonen.

Ausmus (1973) vond wel een duidelijke correlatie tussen de mate van zuurstof-opname en ATP concentraties in wortels van *Liriodendron* sp. terwijl Witkamp (1973) voor respiratie in schimmelcultures en ATP tevens een duidelijk verband vond.

Het lijkt er echter op dat ATP als maat voor metabolische activiteit in het algemeen niet bruikbaar is (Skjoldal & Bamstedt, 1977).

Uit onderzoeken aan enzymkinetiek en pool-levels van adenosines in cellen is gebleken dat metabolische activiteit meer afhankelijk is van de relatieve samenstelling van de adenosines (ATP, ADP, AMP) dan van één van de concentraties an sich.

De relatieve samenstelling van de adenosines werd door Atkinson (1967) omschreven als de adenylate energy charge (AEC):

$$AEC = \frac{[ATP] + 1/2[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

De waarde van de adenylate energy charge kan liggen tussen 0 en 1; is er veel AMP dan zal de waarde dicht bij 0 liggen, bij veel ATP dicht bij 1.

Volgens Atkinson wordt de AEC waarde gewoonlijk echter gebufferd tussen 0.8 en 0.9 ten gevolge van enzymactiviteiten. Chapman (1971) vond een correlatie tussen de AEC en de mate van groei bij de bacterie *E. coli*: actieve groei vond plaats wanneer AEC 0.8; bij 0.55 AEC 0.8 bleven de bacteriën in leven zonder groei, terwijl sterfte optrad wanneer AEC 0.55.

Chapman noemde bacteriën met een AEC tussen 0.55-0.75 gestressed. Aangezien de AEC de hoeveelheid opgeslagen energie in het adenylate system weergeeft is het een goed biochemisch meetinstrument voor stress (Giesy, 1981). Een stressor zou een verschuiving in de AEC teweegbrengen ten gevolge van een toegenomen energieverbruik dat samenhangt met fysiologische verdedigings-mechanismen.

Bij organismen hoeft de waarde van niet-gestressed individuen niet altijd gelijk te zijn. Skjoldal & Bamstedt (1977) vonden een seizoensvariatie in de AEC van zoöplankton met hogere waarden ten tijde van reproductie. Als gemiddelde waarde voor zoöplankton vonden ze 0.7.

I.1. Bioluminescentie

Wanneer een substantie wordt blootgesteld aan energie, bijvoorbeeld warmte of straling, wordt vaak energie geabsorbeerd. De energie-inhoud van die substantie is dan toegenomen. Moleculen kunnen energie opnemen waarbij electronen worden "aangeslagen" en op een hoger energienivo komen.

Meestal is deze toestand instabiel en zullen de electronen weer "terugvallen" in hun grondtoestand. Hierbij wordt de energie dan weer afgegeven aan de omgeving, bijvoorbeeld in de vorm van licht.

Wanneer bovenomschreven proces plaatsvindt nadat energie uit, door enzymen gekataliseerde chemische reacties, is opgenomen spreekt men van bioluminescentie.

In de onderstaande figuur wordt dit geïllustreerd aan de hand van de bioluminescentie-reactie die in dit onderzoek werd gebruikt om de ATP concentratie te bepalen:

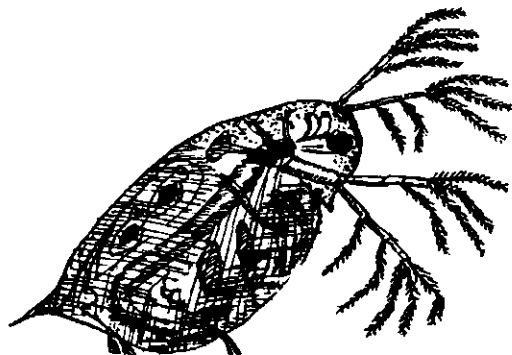
I.3. Daphnia magna in toxiciteitsproeven

In toenemende mate worden we geconfronteerd met gifstoffen in het water. De stoffen komen hierin terecht dmv. rechtstreekse lozing maar ook via de lucht of de bodem.

De aquatische toxicologie houdt zich bezig met de effecten van gifstoffen (toxinen) in het zoete water. Het is bijzonder moeilijk te voorspellen welke effecten een gif heeft op het gehele ecosysteem. Om enigszins een indruk te krijgen worden toxiciteitsproeven gedaan met "vertegenwoordigers" uit het zoetwater-milieu.

De watervlo *Daphnia magna* wordt beschouwd als een meer gevoelige soort voor toxinen (o.a. Sloof, 1983). Verder heeft deze soort de voordelen van:

- eenvoudig te kweken in laboratoria
- genetische identiteit door parthenogenese
- belangrijke rol in de voedselketen
- representant van algemeen voorkomende groep (watervlooien)
- alle leeftijdsklasse zijn het hele jaar door beschikbaar



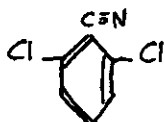
Gewoonlijk worden toxiciteitsproeven in twee klassen verdeeld: de acute- en de chronische testen.

Bij acute toxiciteitsproeven wordt bepaald bij welke concentratie van een gif 50% sterfte optreed binnen 48 uur bij een populatie van een soort onder geconditioneerde laboratorium omstandigheden. Deze concentratie wordt de LC_{50} genoemd ("lethal concentration"). Bij chronische toxiciteitsproeven wordt een populatie van een soort gedurende lange tijd (weken) blootgesteld aan een toxine bij niet dodelijke concentraties. Gekeken wordt dan naar overleven en aantal nakomelingen. Daarnaast wordt wel gekeken naar andere parameters waaronder filtering-rate (Kersting & vd Honing, 1981). Met filtering-rate wordt bedoeld de mate van filteren van water waaruit voedsel wordt opgenomen: daphnia is een filter-feeder.

I.4. Dichlobenil

Alle toxiciteitsproeven in dit onderzoek zijn verricht met dichlobenil in aanvulling op eerder verricht onderzoek (o.a. Kersting & vd Honing, 1981). De handelsnaam van deze stof is **c a s o r o n** en is als granulaat en als "wetable powder" in de handel.

De chemische naam is 2,6-dichloor-benzonitril en de structuurformule:



De oplosbaarheid staat aangegeven als 18 mg/l bij 20°C. Het verdampt gemakkelijk met water (codestillatie) en wordt sterk geabsorbeerd aan bijvoorbeeld polytheen en sommige rubbers. Het is thermisch stabiel. In basisch waterige oplossingen kan 2,6-dichloor-benzamide worden gevormd. In de bodem kan dezelfde omzetting plaatsvinden door micro-organismen (Verloop, 1972).

Herbicide eigenschappen van deze stof:

- remmende werking op kieming en celdeling
- breed werkingsspectrum
- geadviseerd tegen éénjarige kruiden: 4 kg/ha.
- geadviseerd tegen alle onkruid: 20 kg/ha.
- geadviseerd voor waterplanten: 6-12 kg/ha. wateroppervlak
(= bij gemiddelde diepte van 1 m. : 1 ppm)

I.5. Doel van het onderzoek

Het ontwikkelen van een reproduceerbare techniek om de AEC bij *Daphnia magna* te bepalen. Bepalen van de invloed van lage concentraties toxische stof op de AEC-waarde. Nagaan of dit een gevoelige en tijdsbesparende methode zou kunnen worden om toxische stress bij organismen aan te tonen.

II. Materiaal en methoden

II.1. Het kweken van *Daphnia magna*

Daphnia magna werd opgekweekt op TAUB 63 medium (Taub & Dollar, 1968) 1:1 verdund met aqua dest bij een constant klimaat: 18°C en een 14:10 licht-donker regime. Dit "1/2 TAUB-medium" (verder: medium) werd enkele weken doorborreld alvorens het te gebruiken; het belang van dit verouderingsproces is empirisch vastgesteld. Voor gebruik werd het medium over een 0.2 µ filter geperst om deeltjes te verwijderen. Iedere 2 dagen werden de geïncubeerde beesten en de eventuele jongen geteld. De oude dieren werden overgezet in een medium dat bestond uit de helft vers medium en de helft door 40 µ gefiltreerd oud medium.

Er werd gevoerd met de groenalg *Chlorella vulgaris* uit de eigen lab-kweek. Dit gebeurde zodanig dat de aangeboden concentratie $8 \cdot 10^6 \mu^3 \text{ml}^{-1}$ bedroeg. De bepaling van de algenconcentratie van de kweek werd mbv. een Coulter Counter (deeltjesteller) uitgevoerd. Door dit regelmatige verversen en voeren bleef de voedselconcentratie voor de *Daphnia*'s vrijwel constant. Het voer werd afgecentrifugeerd en in het medium gesuspenseerd, omdat het *Chlorella* kweekmedium mogelijk toxinen voor *Daphnia* bevat. De kweek vond plaats in 1 l. accubakken.

II.2. Omschrijving van de proeven

Proef 1.

Incubatie van *Daphnia magna* bij 0 en 1 ppm (deeltje per miljoen deeltjes water) dichlobenil. In 5-voud werden 10 proefdieren (1 dag oude jongen) in 100 ml. bekerglazen geïncubeerd gedurende 18 dagen. De voedselconcentratie (*Chlorella*) na verversing, op maandag, woensdag en vrijdag, was telkens $8 \cdot 10^6 \mu^3 \text{ml}^{-1}$. Bij deze proef werd de *Chlorella* niet eerst afgecentrifugeerd (zie II.1.). Gedurende de incubatieperiode werd sterfte en reproductie genoteerd. Na 18 dagen werd de AEC bepaald.

Proef 2.

Incubatie bij een dichlobenil-belasting van 0, 1 en 3 ppm. Een 10 ppm belasting bleek binnen 7 dagen lethaal. In 3-voud werden 10 jongen van 2 dagen oud in 300 ml. bekerglazen geïncubeerd gedurende 19 dagen alvorens de AEC te bepalen. De voedselconcentratie (Chlorella) was $3 \cdot 10^7 \mu^3 \text{ml}^{-1}$ dus ongeveer 4 keer die van proef 1. Deze overmaat was gekozen om hongeren uit te sluiten terwijl er goede ervaringen mee bestonden. Sterfte en reproductie werden gedurende de incubatieperiode wederom genoteerd.

Proef 3.

Incubaties bij een dichlobenil-belasting van 0,1,3 en 10 ppm. In tweevoud werden 5 proefdieren in 100 ml. bekerglazen geïncubeerd gedurende 4 of 24 uur. De voedselconcentratie was als bij 2, terwijl niet bijgevoerd werd tijdens de incubatie. De AEC werd onmiddellijk na de incubatie bepaald.

II.3. Extractie van de adenosines

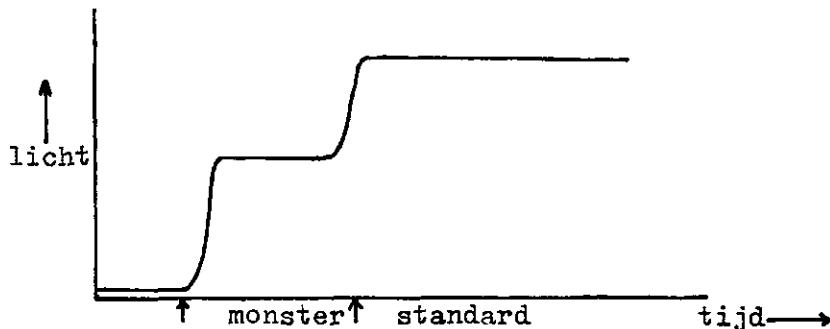
Behalve bij de laatste proeven (3), die verreweg de meest betrouwbare resultaten opleverden, werden de proefdieren gedood na een incubatie door ze zo snel mogelijk vanuit het bekerglas in vloeibare stikstof over te brengen zodat hun metabolisme vrijwel onmiddellijk stopte. Na het vriesdrogen van de monsters (2-10 individuen voor een bepaling) werden de adenosines ATP/ADP/AMP geëxtraheerd bij een 5 minuten incubatie in 1 ml. hete (95°C) Tris-acetaat (0.05M) EDTA (2 mM) buffer. Tijdens de extractie werden de Daphnia's geplet om de extractie verder te bevorderen. Deze methode werd overgenomen uit Skjoldal & Bamstedt (1977).

Het bleek veel beter deze methode te volgen dan de extractie uit te voeren zoals voorgesteld door de firma LKB mbv. 2 vol% TCA (trichloorazijnzuur). Het TCA had een negatief effect op de enzymatische omzettingen van ADP en AMP in ATP.

Hoewel de extractie volgens Skjoldal & Bamstedt (1977) goed verliep is bij proef 3 gekozen de Daphnia's te doden mbv. de hete extractiebuffer ipv. vloeibare stikstof. Dit leverde enorme verbetering op voor de AEC-waarden. Zie discussie.

II.4. AEC-bepaling

Voor de bepaling van de adenylate energy charge moeten de concentraties ATP, ADP en AMP bekend zijn. Met behulp van de ATP-Assay Kit 1243-107 van de firma LKB werd van de monsters de ATP concentratie bepaald en indirect de ADP- en AMP concentratie (zie I.2). De ATP concentratie van het monster wordt hierbij vergeleken met een bekende concentratie (ATP-standard):



Bij proef 1 werden de bepalingen verricht op een Perkin-Elmer Luminometer. Deze werd hiertoe geprogrammeerd voor de "bio-luminescence mode" met de instelling PHOS 60; Fixed Scale 300-500 terwijl de "total emission facility" werd gebruikt. Op een recorder werden de verschillende stappen van de bepaling zichtbaar gemaakt.

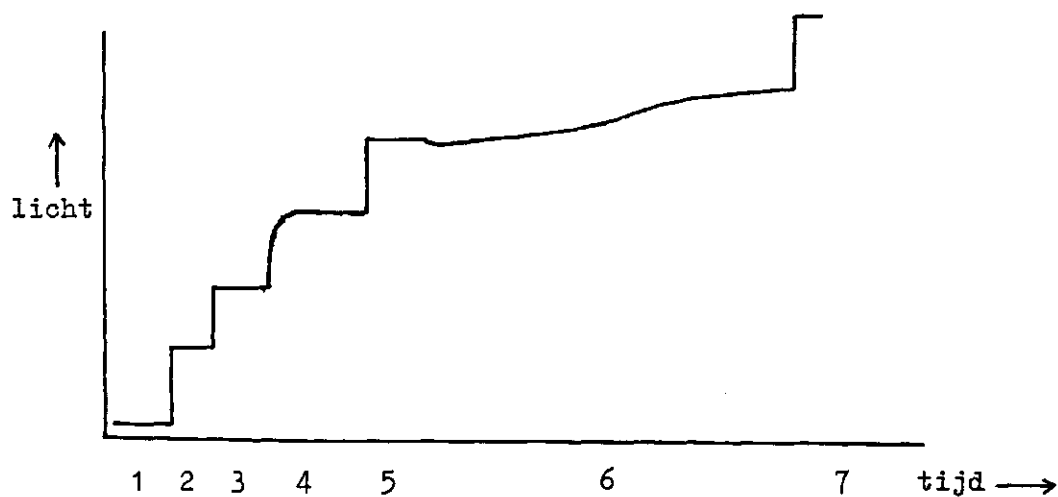
Bij de proeven 2 en 3 werden de bepalingen verricht op een LKB 1250-001 Luminometer. Tijdens deze bepalingen werd, om de fotomultiplier minder te belasten, als ATP-standard een concentratie van 10^{-6} M. gebruikt (ipv. 10^{-5} M. als in proef 1). Alle monsters, ATP standard, ATP monitoring reagent en enzymen, nodig voor de AEC bepaling (zie verder), werden op ijs bewaard.

De ATP-, ADP-, en AMP concentraties werden bepaald volgens onderstaand schema:

ATP-monitoring reagent (200 μ l) + Tris-acetaat EDTA buffer (720 μ l)
 + KAc (kaliumacetaat) (20 μ l)
 + ATP-standard opl. 10^{-5} M. of 10^{-6} M. (10 μ l)
 + monster (10-50 μ l)
 + pyruvaatkinase (PK: 10 μ l)
 + phosphoenolpyruvate (PEP: 10 μ l)
 + ATP-standard opl. 10^{-5} M. of 10^{-6} M. (10 μ l)
 + adenylaatkinase (AK: 10 μ l)
 + ATP-standard opl. 10^{-5} M. of 10^{-6} M. (10 μ l)

Door de gemeten concentraties ATP/ADP/AMP in het monster telkens te relateren aan de bekende ATP-standard konden deze nauwkeurig en reproduceerbaar bepaald worden. Voor afwijkingen in de tijd, bijvoorbeeld door afname van de gevoeligheid van het monitoring reagent, kon zo eveneens gecorrigeerd worden.

Op een recorder werden de verschillende stappen van het reactieverloop zichtbaar gemaakt zodat de kinetiek van de enzymatische omzettingsreacties konden worden gevolgd:



- 1= basissignaal luminometer
- 2= ATP-standard
- 3= monster ATP
- 4= omzetting ADP \rightarrow ATP
- 5= ATP-standard
- 6= omzetting AMP \rightarrow ATP
- 7= ATP-standard

II.5. Chemicaliën

a. De bepalingen werden uitgevoerd in Tris-acetaat buffer: in 1000 ml. maatkolf 12.12 g. Tris oplossen in \pm 800 ml. bidest, na schudden toevoegen 0.832 g. EDTA (zout) en op pH 7.75 brengen met azijnzuur.

- b. Extracties: bovenstaande oplossing werd 1:1 verdund met bidest en de pH werd op 7.4 gebracht met azijnzuur.
- c. ATP-standard: de inhoud van het potje (LKB ATP-Assay Kit) in 10 ml. bidest oplossen en invriezen in porties van 100 μ l. De concentratie was zo 10^{-5} M. Een 10^{-6} M. oplossing ontstond door 10x te verdunnen.
- d. ATP-monitoring reagent: inhoud van het potje (LKB) oplossen in 10 ml. bidest en invriezen in porties van 450 μ l., vlak voor gebruik ontdooien en op ijs bewaren.
- e. Enzymen (Sigma): pyruvaat kinase (P1506) 80 μ l. in 800 μ l. buffer; phosphoenolpyruvaat (PEP7252) 4.66 mg. oplossen in 1 ml. bidest; myokinase (MK): voor de proeven 1 en 2 werd 40 μ l. MK3003 in 800 μ l. buffer verdund, voor proef 3 werd de inhoud van een potje (MK3266) opgelost in 2.5 ml. buffer en in porties van 50 μ l. ingevroren. Vlak voor gebruik werd het ontdooid en op ijs bewaard.
- f. Kaliumacetaat (KAc) 1 M. oplossing.
- g. Dichlobenil-stockoplossing: los 10 mg. op in 1 l. TAUB 1:1 verdund met bidest ("1/2 TAUB). De 10 ppm oplossing werd voor gebruik bij incubaties verder op de gewenste concentratie gebracht door te verdunnen met 1/2 TAUB. NB: dichlobenil lost slecht op in water; het oplossen in deze concentratie kostte een week.

II.6. Bepaling eindconcentratie dichlobenil

Dichlobenil is een vluchtige stof. Om een indruk te krijgen van het gedrag van de stof tijdens de incubaties en de schommelingen in concentratie werd bij het verversen van het incubatiemedium (op maandag/woensdag/vrijdag) de concentratie dichlobenil in het oude medium bepaald. Hiertoe werd 2 ml. van het oude medium na toevoeging van 2 ml. Na_2SO_4 en 2 ml. petroleumether gedurende 2 minuten goed geschud. Hierna werd het (bovenste) petroleumether-laagje met daarin de dichlobenil afgezogen en voor gaschromatografische dichlobenil-bepaling naar het R.I.N. in Arnhem gestuurd.

III. Resultaten en discussie

III.1. ATP-bepaling

Na aanvankelijk uitproberen met de ATP-standard oplossing bleek het zeer goed mogelijk ATP aan te tonen mbv. de LKB Kit. Het signaal dat ontstond was zeer stabiel; de methode zeer gevoelig. Bij het tussentijds overgaan van de Perkin-Elmer Luminometer naar die van LKB viel op dat de laatste een stabielere signaal geeft maar een gevoeliger fotomultiplier heeft. Er werd zodoende gekozen de totale lichtoutput onder de 0.5 V te houden (bij gain=8.2). De ATP-standard werd hiertoe verdund tot 10^{-6} M.

III.2. ADP en AMP

In eerste instantie leidden de toevoegingen van de enzymen niet tot een vlotte omzetting van ADP en AMP in ATP bij bepalingen aan monsters. De werking van de enzymen werd getest door pure ADP en AMP toe te voegen. Het bleek dat de enzymen in hun werking werden geremd door het oorspronkelijk gebruikte extractiemiddel trichloorazijnzuur (TCA). Bij gebruik van hete Trisbuffer als extractiemiddel bestond dit probleem niet.

Verder bleek dat er grote verschillen bestonden in efficiency voor de verschillende enzymen. Door middel van proeven met pure ADP en AMP werd gezocht naar de snelste en meest volledige omzetting in ATP. Uiteindelijk bleek de beste enzymcombinatie:

- pyruvaatkinase P1506 20x verdund 10 μ l. toevoegen
- fosfoenolpyruvaat P7252 1 mM. 10 μ l. toevoegen
- myokinase M3266 inhoud oplossen in 2.5 ml. buffer 10 μ l. toevoegen

Het toevoegen van kaliumacetaat tijdens de AEC-bepaling bleek empirisch het beste geheel voorin het toevoegschema te kunnen plaatsvinden (p.8 onderaan). Werd het later toegevoegd dan bleek het een effect te hebben op de lichtopbrengst (verlaging).

III.3. Extracties

Het in de handleiding van LKB Kit genoemde extractiemiddel voldeed niet. Bij een empirisch gevonden optimum concentratie van het extractiemiddel van 2 vol% vond duidelijke remming plaats van de

hierboven genoemde omzettingsreacties waarbij enzymen nodig zijn. Het bleek beter de adenosines te extraheren tijdens een 5-8 minuten durende incubatie in 1 ml. 95°C hete tris-acetaat-EDTA buffer 1:1 verdund met bidest (pH 7.4).

III.4. De incubaties

Proef 1.

Deze chronische toxiciteitsproef leverde gegevens op die aanvankelijk bijzonder moeilijk te interpreteren waren. Zie tabel 1 p.13 De incubatie mislukte in die zin dat bij de blanco (0 ppm dichlobenilbelasting) veel sterfte optrad bij volwassen Daphnia's. Bij de discussie van proef 2 wordt hier nader op in gegaan. Het aantal jongen is voor beide concentraties dichlobenil (0 en 1 ppm) ongeveer gelijk. Het was mislukt een grove indruk te krijgen omtrent de werking van dichlobenil: nader onderzoek was nodig, met meer concentraties.

Proef 2.

Omdat het onzeker was wat de oorzaak van de sterfte bij de blanco teweegbracht, werd naast een incubatie in Amsterdam er tevens een in Leersum uitgevoerd. Ook hier waren de resultaten niet optimaal: zie tabellen 2 en 3 pp.14 en 15.

Een belasting met 10 ppm dichlobenil werd na 7 dagen beëindigd: de dieren gingen dood.

Bij de Amsterdamse kweek was de sterfte bij 0 ppm dichlobenil wederom zeer groot (tabel 2). Bij 1 ppm was de sterfte minder en bij 3 ppm trad nauwelijks sterfte op. Het aantal juvenielen was bij 0 ppm het kleinst en bij 3 ppm het grootst. Deze opmerkelijke resultaten kunnen worden verklaard met de volgende hypothese.

Het bleek dat de Daphnia's die dood gingen bij 0 en 1 ppm zwaar geïnfecteerd waren met *Vorticella* sp. (Klasse Ciliata) terwijl deze infectie niet voorkwam bij een 3 ppm belasting. Het lijkt er op dat de gevonden resultaten in tabel 2 een resultante zijn van twee tegengestelde effecten:

enerzijds ondervonden de proefdieren hinder van de dichlobenilbelasting (bij 10 ppm lethaal) terwijl anderzijds dichlobenil een *Vorticella*-infectie schijnt te voorkomen!

PROEF 1

dichlobenil	0 ppm					1 ppm				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
aantal										
op datum										
05-12	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
07-12	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
10-12	10	10	9	10	10	10	10	10	10	10
12-12	9	10	9	10	9	10	10	10	10	10
14-12	8	10	8	10	8	10	10	9	10	10
17-12	8	10	8	10	8	9	10	9	10	10
19-12	8	9	6	10	8	9	10	9	10	10
21-12	6	7	5	10	8	9	10	8	10	10
aantal jongen										
op datum										
14-12						3	1	4	2	1
17-12	10	4	6	1	2	7	9	5	3	9
19-12		6	5	1	4		1	2		1
20-12	3					8				
totaal	13	10	11	2	6	18	16	11	5	11
AEC		.62	.65	.59	.67		.62	.59	.64	.56

tabel 1: incubatie van *Daphnia magna* bij een dichlobenil-belasting van 0 en 1 ppm. gestart op 3 dec.1984 met proefdieren van 2 dec.

PROEF 2

dichlobenil	0 ppm			1 ppm			3 ppm		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
aantal									
op datum									
25-1	10	10	10	10	10	10	10	10	10
28-1	10	10	10	10	10	10	10	10	10
30-1	10	10	10	10	10	10	10	10	10
01-2	10	10	10	10	10	10	10	10	10
04-2	10	10	9	10	9	10	10	10	10
06-2	4	6	5	7	6	6	10	10	10
08-2	1	1	1	6	4	3	9	8	10
11-2	0	1	1	5	2	1	8	8	10
aantal jongen									
op datum									
30-1	19				9		5		
01-2	104	89	61	143	149	155	108	214	160
04-2	29		4	98	47	62	96	3	45
06-2	14			55	56	24	104	180	162
08-2				11	14		46	2	22
11-2				1	2	5	25	31	23
totaal	166	89	65	308	277	246	384	430	412
AEC	0.45			0.33			0.32	0.32	0.37

tabel 2: incubatie van *Daphnia magna* bij een dichlobenil-belasting van 0, 1 en 3 ppm. gestart op 23 jan.1985 met proefdieren van 20 jan.

Gezien het geringe aantal overlevende proefdieren bij 0 ppm en 1 ppm werden hier de proefdieren bij elkaar voor één AEC bepaling gebruikt.

PROEF 2

Kweek R.I.N.Leersum

dichlobenil	0 ppm		1 ppm		3 ppm		10 ppm	
	A	B	A	B	A	B	A	B
aantal op datum								
07-1	20	20	20	20	20	20	20	20
09-1	20	20	20	20	20	20	20	20
11-1	20	20	20	20	20	20	20	19
14-1	20	20	20	20	20	20	9	11
16-1	20	20	20	20	20	20	0	0
18-1 tot 24-1	20	19	20	19	20	20		
24-1 aantal gebruikt	20	10	20	10	20	10		
25-1 tot 08-2	20	9	20	9	20	10		
08-2 tot 15-2	20	9	18	9	20	10		
15-2 tot 25-2	20	9	18	9	19	10		
25-2	20	7	18	9	19	9		
aantal jongen op datum								
07-1 tot 14-1	63	71	59	63	57	99	31	60
14-1 tot 24-1	65	72	95	126	113	113		
24-1 tot 26-2	467	388	560	447	585	470		
AEC	0.70	0.66	0.67	0.68	0.68	0.68		

tabel 3: incubatie van *Daphnia magna* bij een dichlobenilbelasting van 0, 1, 3 en 10 ppm. gestart op 5 jan.1985 met proefdieren geboren op 4 jan. Deze kweek werd in het R.I.N. te Leersum uitgevoerd om het risico van misgaan van de kweek te spreiden. Met dank aan Geeske Admiraal.

Echter ook de incubatie in Leersum, zonder Vorticella-infectie, leverde de grootste reproductie op bij een 3 ppm belasting. Het vermoeden bestaat dat dit te maken heeft met de filtering-rate van *Daphnia magna*. Uit onderzoek is gebleken dat dichlobenil een verlagend effect heeft op de filtering-rate (=aantal ml. water dat in 1 uur door 1 *Daphnia* wordt gefilterd van voedsel-deeltjes). Bij een belasting van 1 ppm vond bij een 4 uurs incubatie een afname van 50% plaats in de filtering-rate ten opzichte van de blanco (Kersting & vd Honing, 1981).

In een gesloten systeem (incubatie-bekerglas) heeft dit tot gevolg dat de voedselconcentratie gelijkmatiger blijft bij dichlobenil-belasting. En juist voor grote schommelingen in de voedselconcentratie is *D.magna* gevoelig (dit kan o.a. leiden tot de vorming van winter-eieren).

Wellicht is dit een mogelijke oorzaak voor het grotere aantal nakomelingen bij dichlobenil belasting.

Omdat bij incubatie in Amsterdam een groter incubatievolume werd gebruikt speelde dit effect hier waarschijnlijk minder een rol.

Proef 3.

Om het aantal AEC-bepalingen te vergroten is de laatste periode van dit onderzoek besteed aan 24 uurs incubaties bij een dichlobenilbelasting van 0, 1, 3 en 10 ppm en enkele 4 uurs incubaties. Gedurende deze incubaties bleef de voedselconcentratie vrijwel gelijk. Effecten zoals bij proef 2 optraden zijn daarmee uitgesloten. Er vond geen sterfte plaats tijdens deze incubaties. Dit sluit goed aan bij de eerder gevonden resultaten en eerdere onderzoeken: vd Honing (1979) vond geen sterfte bij een blootstelling gedurende 10 dagen aan dichlobenil-concentraties 0-3.6 ppm. Wel vond Tooby (1978) een LC_{50} waarde (48hr) van 7.8 ppm.

III.5. Dichlobenil-concentraties

Het bleek bijzonder moeilijk een stockoplossing te maken van precies 10 ppm. Controle op de stockoplossing was nodig. In drie weken tijd nam de concentratie af van 8.92 ppm naar 6.50 ppm. Ook tijdens de incubatietijd (telkens 2 dagen met één medium) nam de dichlobenil-concentratie af. Twee redenen kunnen hiervoor in ieder geval debet aan zijn: verdamping en opname door *Daphnia*.

De dichlobenil-concentraties in het medium na 2 dagen incubatie waren voor proef 1 (beginconcentratie 0.892 ppm):

bekerglas nr.	1	2	3	4	5
dd.					
05-12	0.480	0.500	0.470	0.450	0.460
07-12	0.499	0.484	0.517	0.577	0.565
10-12	0.527	0.537	0.531	0.530	0.514
12-12	0.611	0.573	0.608	0.610	0.602
14-12	0.585	0.586	0.590	0.575	0.594
17-12	0.514	0.510	0.509	0.525	0.533

De dichlobenil-concentraties in het medium na 2 dagen incubatie waren voor proef 2 (beginconcentraties \pm 1 en 3 ppm):

bekerglas nr.	1a	1b	1c	3a	3b	3c
dd.						
28-1	0.792	0.731	0.492	2.441	2.433	2.332
30-1	0.688	0.676	0.739	2.099	2.537	2.177
01-2	0.635	0.611	0.514	2.108	2.021	1.898
04-2	0.513	0.598	0.493	-	1.698	2.193
06-2	0.483	0.571	0.637	1.953	2.080	2.032
08-2	0.528	0.625	0.510	1.790	1.827	1.553
11-2	0.484	0.460	0.350	-	1.124	1.987

Het is gebleken dat de stock-oplossing waarvan de 1 en 3 ppm concentraties werden verdund tegen het einde van de proef geen 10 ppm meer bedroeg maar slechts 6.504 ppm.

III.6. De AEC-waarden

Proef 1.

De gevonden AEC-waarden liggen redelijk hoog (0.56-0.67) in vergelijking tot later gevonden waarden. Zie tabel 1.

Dit ligt echter voornamelijk aan het onderwaarderen van de AMP concentratie. De reactie $\text{AMP} \rightarrow \text{ATP}$ verliep bij de hier (nog niet geoptimaliseerde) gebruikte enzymsamenstelling traag. Vaak duurde de omzetting meer dan 30 minuten. Door de kleine hellingshoek die bij deze omzetting op de recorder te zien was, was het eindpunt van de reactie moeilijk te beoordelen. Ook was het signaal op de hier gebruikte luminometer grilliger dan bij de later gebruikte. Deze factoren verklaren tevens de spreiding van de AEC-waarden onderling.

Proef 2.

De AEC-waarden van tabel 2 (Amsterdamse incubatie) liggen uitgesproken laag (0.32-0.45). De bepalingsmethode waren beter dan bij proef 1: ADP en AMP waren goed aantoonbaar. Een verklaring voor deze lage waarden werd later gevonden: zie de discussie van proef 3.

Doordat de AEC-waarden van de Leersum incubatie pas werden bepaald nadat de bepalingsmethode belangrijk was geoptimaliseerd (zie discussie proef 3) liggen deze veel hoger (0.66-0.70) terwijl de betrouwbaarheid van deze cijfers veel groter is dan bovengenoemde. De uitkomsten zouden kunnen leiden tot de conclusie dat mbv. de AEC geen invloed van dichlobenil is aan te tonen in een concentratiereeks van 0-3 ppm. Wel ligt de AEC bij 0 ppm iets hoger bij A, waar geen sterfte was opgetreden (tabel 3).

dood door ze uit het incubatiebekerglas direct in de hete extractiebuffer te deponeren, werden aanzienlijk hogere AEC waarden gevonden dan bij de behandeling die steeds hiervoor werd gebruikt (naar Skjoldal & Bamstedt, 1977):

	vl.stikstof gedood/gevriesdroogd		hete tris gedood	
AEC	0.36	0.36	0.67	0.69

Bij de AEC-bepalingen werden naar aanleiding van bovenstaande bevindingen daphnia's van 20 dagen oud geïncubeerd en hete-tris gedood.

GROEP II

Alle incubaties in duplo

	0	1	3	10	datum
AEC1	0.58	0.58	0.52	0.56	04-3
AEC2	0.59	0.58	0.67	0.58	04-3
AEC1	0.61	0.51	0.53	0.64	05-3
AEC2	0.58	0.51	0.51	0.58	05-3
AEC1	0.54	0.48	0.50	0.55	06-3
AEC2	0.55	0.49	0.43	0.53	06-3
AEC1	0.58	0.55	0.54	0.53	07-3
AEC2	0.59	0.49	0.50	0.50	07-3
AEC3	0.59			0.52	07-3

Op 8 maart werden van de op 5 jan. ingezette incubaties in het R.I.N. te Leersum de AEC's bepaald volgens bovenstaande methode:

	0	1	3
AEC1	0.66	0.68	0.68
AEC2	0.70	0.67	0.68

Het is opvallend dat Daphnia's van 20 dagen oud een hogere AEC hebben dan die van 11 dagen oud. Dit is iets waar rekening mee zal moeten worden gehouden tijdens toxicologisch onderzoek.

Eén van de belangrijkste vindingen in dit onderzoek is het negatieve effect dat het vriesdrogen heeft op de AEC-waarde. De verklaring moet worden gezocht in de biochemische omzetting van ATP in AMP (dat een stabielere adenosine is dan ATP) tijdens het oplopen van de temperatuur gedurende het vriesdrogen. In de literatuur is hierover wel iets bekend hoewel men tot tegenstrijdige conclusies komt (o.a. Skjoldal & Bamstedt (1977) en Hiltz et al.(1974)).

Bij de 24 uren incubaties bij groep II(p.20) valt op dat de AEC-waarden bij 0 ppm bijna overal hoger zijn dan bij 1 en 3 ppm. Bij 10 ppm valt een grillig beeld te zien: soms is de AEC zelfs hoger dan bij de blanco. Een verklaring hiervoor is moeilijk te vinden.

Alle waarden in groep II liggen lager dan de eerste waarden die werden gevonden bij overschakeling op de niet-vriesdroog methode en tevens lager dan de waarden gevonden bij de Leersum-incubatie bij proef 2.

Aangezien de proefdieren in groep II wederom geïnfecteerd waren met Vorticella valt dit misschien te verklaren. Het kan zijn dat de proefdieren gestressed waren door de infectie waardoor een lagere AEC werd gevonden. Het kan ook zijn dat de gemeten AEC voornamelijk werd veroorzaakt door het aandeel van Vorticella terwijl deze parasiet een lagere AEC heeft dan Daphnia. Nader onderzoek op dit terrein is sterk gewenst!

Het lijkt erop dat de AEC voor niet-gestressde Daphnia's ligt rond de 0.70, gebaseerd op de gegevens van de Leersum-incubatie.

Deze waarde wijkt af van de door Atkinson (1967) gevonden AEC-waarden voor normale, niet-gestressde organismen. Wel lijkt de waarde sterk op die gevonden door Skjoldal & Bamstedt (1977) als gemiddelde AEC voor zoöplankton in Noorse fjorden

(zie inleiding). De afwijking van de Atkinson waarde (0.8-0.9) is misschien te verklaren uit het feit dat Daphnia's beschikken over een perceptie-orgaan en vluchtgedrag, dit in tegenstelling tot de micro-organismen waar Atkinson mee werkte. Gezien de snelle turnover van de adenosines, kleiner dan een seconde, is deze verklaring wellicht acceptabel.

IV. Conclusies en aanbevelingen

De gevonden AEC-waarden voor *Daphnia magna* bleken erg afhankelijk van de gevolgde methode.

De hoogste (meest betrouwbare) waarden werden gevonden wanneer de proefdieren werden gedood in hete Trisacetaat-EDTA buffer.

Tevens werden de adenosines in deze vloeistof het best geëxtraheerd. De gebruikte enzymen voor de omzettingsreacties van AMP en ADP in ATP spelen tevens een rol.

Vorticella-infectie van *Daphnia* geeft een verlaging in de AEC. De kans op deze infectie neemt af bij toenemende dichlobenil concentraties.

De AEC voor niet-gestressede *Daphnia magna* ligt mbv. de boven beschreven methode rond de 0.70.

Een dichlobenil-belasting van 10 ppm is letaal voor *Daphnia magna* binnen 7 dagen. Een belasting van 1 en 3 ppm heeft bij langdurige incubaties geen invloed op de AEC. Het aantal nakomelingen bij deze concentraties is iets groter dan bij 0 ppm. Waarschijnlijk ligt dit aan de voedselconcentratie die, bij een door dichlobenil geïnduceerde afname in de filtering-rate bij *Daphnia*, gelijkmatiger blijft.

Bij 24 uren incubaties zijn de AEC-waarden bij 0 ppm bijna overal hoger dan bij een 1-3 ppm dichlobenil belasting.

Omdat de methode pas tegen het einde van dit onderzoek goede, reproduceerbare resultaten opleverde zijn slechts trends aan te geven wat betreft de invloed van dichlobenil op de AEC van *Daphnia magna*. Gezien de resultaten van de langdurige incubaties lijkt het er op dat *Daphnia* nauwelijks gestressed raakt bij een dichlobenil-belasting van 1-3 ppm.

Met behulp van de hier ontwikkelde methode lijkt het mogelijk de invloed van zowel toxische- als door andere oorzaken geïnduceerde stress op *Daphnia magna* te bepalen, vooralsnog onder geconditioneerde lab-omstandigheden.

V. Literatuur

- Atkinson, D.E. (1971): Adenine nucleotides as stoichiometric coupling agents in metabolism and as a regulatory modifier: the adenylate energy charge. In: Metabolic regulation pp. 1-21 Ed. by H.G.Vogel. Academic Press, New York.
- Atkinson, D.E. & G.M.Walton (1967): ATP conservation in metabolic regulation. *J.Biol.Chem.* 242: 3239-3241.
- Ausmus, B.S. (1973): The use of the ATP assay in terrestrial decomposition studies. *Bull.ecol.Res.Comm.Stockholm* 17: 223-234.
- Chapman, A.G. et al. (1971): Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J.Bact.* 108: 1072-1086.
- Giesy, J.P. et al. (1981): Energy charges in several molluscs and crustaceans: natural values and responses to cadmium stress. *Verh.Internat.Verein.Limnol.* 21: 205-220.
- Hiltz, D.F. et al. (1974): Accelerated nucleotide degradation and glycolysis during warming. *J.Fish.Res.Bd Can* 31: 1181-1187.
- Holm-Hansen, O. (1969): Determination of microbial biomass in ocean profiles. *Limnol.Oceanogr.* 14: 740-747.
- Honing, H.v.d. (1979): De voedselopname van *D.magna* onder invloed van het herbicide dichlobenil. Stageverslag R.I.N.
- Kersting, K. & H.v.d.Honing (1981): Effects of the herbicide dichlobenil on the feeding and filtering rate of *D.magna*. *Verh. Internat.Verein.Limnol.* 21: 1135-1140.
- Myhrman, A. (1978): Analytical application of ATP Monitoring by firefly bioluminescence. *LKB Application Note* 314.
- Patterson, J.W. et al. (1972): Measurement and significance of ATP in activated sludge. *Envir.Sci.Technol.* 4: 569-575.
- Skjoldal, H.R. & U.Bamstedt (1977): Adenine nucleotides in zooplankton. *Mar.Biol.* 42: 197-211.
- Sloof, W. (1983): Biological effects of chemical pollutants in the aquatic environment and their indicative value. Proefschrift.
- Witkamp, M. (1973): Compatibility of microbial measurements. *Bull.ecol.Res.Comm.Stockholm* 17: 179-188.
- Tooby, T.E. (1978): A scheme for the evaluation of hazards to non-target aquatic organisms from the use of chemicals. *Proc. EWRS 5th Symp.on aquatic Weeds*: 287-294.