

TOXISCHE EN SUBLETHALE EFFEKTEN VAN KOPER EN ZINK
BIJ ARENICOLA MARINA EN DE INVLOED VAN KOPER
EN ZINK OP DE ZUURSTOFAFFINITEIT VAN HET
HEMOGLOBINE VAN ARENICOLA MARINA*

door

W.K. OSBORNE EN E. VERHAAF

INHOUD

I. Samenvatting en Summary	2
II. Inleiding	4
III. Materiaal en methoden	7
1. Materiaal	7
2. Toxiciteitsexperimenten	7
3. Anodische heroplossingsvoltametrie	8
4. Behandeling van het bloedmonster	10
5. Bepaling van de hemoglobine-zuurstofeven- wichtskurven	11
IV. Toxiciteitsexperimenten	12
A. Waarnemingen	12
B. Resultaten	15
C. Discussie	21
V. Invloed van koper en zink op de zuurstofbindende eigenschappen van het hemoglobine	25
A. Resultaten	25
1. Zuurstofaffiniteit	25
2. Bohr effekt	25
B. Discussie	27
VI. Referenties	30

*Onderzoek in het kader van een praktisch afstudeeronderwerp
voor de 2^e graads lerarenopleiding in de biologie bij Dr.
N.M.D. Houben, (S.O.L., Utrecht). Op het NIOZ te Texel bege-
leid door Dr. J.M. Everaarts.

I. SAMENVATTING

De toxiciteit van Cu^{2+} en Zn^{2+} in concentraties van respectievelijk 2-40 ppm en 10-200 ppm is onder statische omstandigheden onderzocht voor *Arenicola marina* L. (pH 7,70; 15°C). De Lt_{50} -waarden voor verschillende concentraties Cu^{2+} en Zn^{2+} liggen tussen 47 en 129 uur en Lc_{50} (96 hr)-waarden zijn 1,6 ppm voor Cu^{2+} en 136 ppm voor Zn^{2+} . Verschillende zichtbare sublethale effecten zijn waargenomen. Bij proefdieren in blanco medium (pH 7,70) en in media met verschillende H_3O^+ -aktiviteit (pH 6,35; 6,70; 7,10) trad geen mortaliteit op gedurende het gehele experiment (maximaal 186 uur).

De achteraf, door middel van anodische heroplossingsvoltametrie bepaalde concentraties Cu^{2+} en Zn^{2+} in het medium, zijn lager dan die welke bij aanvang van het experiment aan het medium werden toegevoegd.

De zuurstofaffiniteit van een oplossing van *A. marina* hemoglobine, waarin Cu^{2+} en Zn^{2+} in concentraties van $5 \cdot 10^{-7}$ tot en met $5 \cdot 10^{-3}$ molair aanwezig waren, werd gemeten met behulp van de zuurstofdiffusiekamertechniek. De halfverzadigingsspanningen (p_{50} -waarden) liggen tussen 6,5 mm Hg en 0,22 mm Hg bij pH 6,6; 7,0; 7,5 en 8,1 (15°C). De Bohr-factor verandert van -0,59 voor zuiver *A. marina* hemoglobine tot -0,38 voor hemoglobine met een concentratie van $5 \cdot 10^{-5}$ molair Cu^{2+} , en tot -0,42 voor eenzelfde concentratie Zn^{2+} . De resultaten worden besproken in relatie tot de gemeten milieu parameters.

Dankwoord.-Hierbij willen wij allereerst Jan Everaarts bedanken voor de steun en begeleiding bij ons onderzoek (We hebben veel van je geleerd). Verder waren er vele mensen die ons behulpzaam zijn geweest op allerlei gebied. Enkelen willen wij

met name noemen. Allereerst Kees Kramer voor zijn hulp bij de ASV-bepalingen en Albert Kok die steeds met raad en daad klaar stond op het laboratorium van de afdeling experimentele biologie. Tot slot willen we Jan Duinker bedanken voor het kritisch doorlezen van het verslag en alle medewerkers van de afdeling zeeverontreiniging voor de leuke en fijne sfeer tijdens onze tijd op het NIOZ.

SUMMARY

The toxicity of Cu^{2+} and Zn^{2+} in concentrations of respectively 2-40 ppm and 10-200 ppm for the lugworm *Arenicola marina* L. was determined under static conditions (pH 7.70; 15°C). The values of Lt_{50} for the different concentrations of Cu^{2+} and Zn^{2+} vary between 47 and 129 hours, the values of Lc_{50} (96 hr) are 1.6 ppm for Cu^{2+} and 136 ppm for Zn^{2+} . Different kinds of visible sublethal effects are observed. There was no mortality during the whole experiment (max. 186 hr) for specimen in blanco medium (pH 7.70) and for animals in medium with different activity of H_3O^+ (pH 6.35; 6.70; 7.10). The quantity of toxicant in the medium, measured at the end of the experiment by anodic stripping voltammetry, was less than the quantity that was added to the medium at the start of the experiment.

The oxygen affinity of a solution of *Arenicola* haemoglobin in which the concentration of Cu^{2+} or Zn^{2+} was $5 \cdot 10^{-7}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ M. was determined using an oxygen diffusion chamber technique. The O_2 -partial pressures at halfsaturation (p_{50}) are 6.5 mm Hg to 0.22 mm Hg (pH 6.6; 7.0; 7.5; 8.1; 15°C). The Bohr-factor varied from -0.59 for pure *Arenicola* haemoglobin to -0.38 for

haemoglobin with Cu^{2+} in a concentration of $5 \cdot 10^{-4}$ M and to -0,42 for the same concentration of Zn^{2+} . The results are discussed in relation to the measured environmental parameters.

II. INLEIDING

In veel gevallen vindt in een organisme transport van zuurstof van het respiratoire oppervlak naar de weefsels plaats door middel van een bloedpigment. Hemoglobine en hemocyanine zijn de voornaamste ademhalingspigmenten. Het koperhoudende hemocyanine komt alleen voor bij de evertibraten, het ijzerhoudende hemoglobine bij vertebraten en evertibraten.

Hemoglobine kan voorkomen als tetrameer met een molekulgewicht van 60.000 - 70.000 in bloedlichaampjes, maar ook als hoogmoleculair pigment (erythrocrurine), opgelost in de coeloomvloeistof.

De belangrijkste eigenschap van hemoglobine is de reversibele reactie met zuurstof, die gebaseerd is op de binding van een molecuul zuurstof aan het ferro-ion van de heemgroep. Het ijzeratoom blijft hierbij tweewaardig (KARLSON, 1964). De relevante zuurstofbindende parameters van het bloedpigment zijn de affiniteit voor zuurstof en de invloed hierop van kleine (an)organische molekulen, protonen (Bohr effect) en de temperatuur. Voor zoogdierhemoglobine blijkt de zuurstofaffiniteit af te nemen bij hogere concentraties van natuurlijk voorkomende ionen (BARCROFT & CAMIS, 1909; BARCROFT & ROBERTS, 1909).

Bij hemoglobine van *Arenicola marina* L. blijkt de zuurstofaffiniteit echter toe te nemen met stijgende concentraties van natuurlijk voorkomende ionen, zoals KCl , K_2SO_4 , MgSO_4 en CaCl_2 .

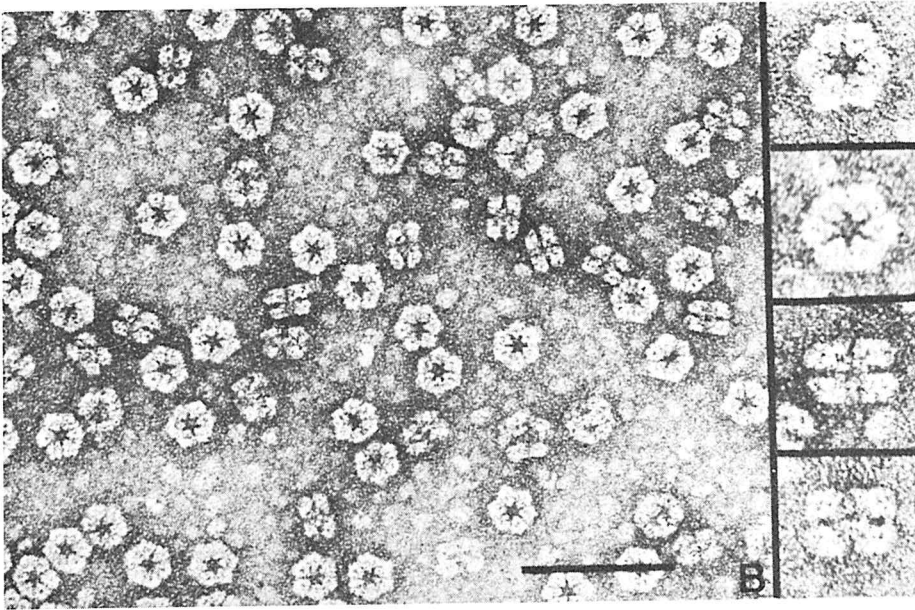
(WAXMAN, 1971; EVERAARTS & WEBER, 1974). EVERAARTS (1971) vond een stijging van de zuurstofaffiniteit van *Arenicola* hemoglobine bij een stijgende pH, terwijl bij een stijgende temperatuur een verlaging van de O_2 -affiniteit plaatsvindt (WEBER, 1972; RASMUSSEN & WEBER, 1979).

Het hemoglobine van de wadworm *Arenicola marina* is een proteïne, opgebouwd uit 12 subeenheden, die ieder bestaan uit circa 15 peptideketens, die onderling met waterstofbruggen zijn verbonden (Plaat I).

Iedere peptideketen heeft één heemgroep als aktieve (prosthetische groep. Het molekulgewicht bedraagt ongeveer $3 \cdot 10^6$ (ROCHE et al, 1960; LEVIN, 1963; ROCHE, 1965; FLORKIN, 1969; WEICHELMAN & PARKHURST, 1972; EVERAARTS & WEBER, 1974).

Dit verslag handelt over een onderzoek dat was gericht op verkrijgen van gegevens over toxische en sublethale effecten bij *Arenicola* als reactie op twee verontreinigende (in natuurlijke omstandigheden in concentraties van circa 1 mg.l^{-1} aanwezige) ionen, Cu^{2+} en Zn^{2+} en de invloed van deze ionen op de zuurstofaffiniteit van het *Arenicola* hemoglobine.

Arenicola (Plaat II) is voor dit doel zeer geschikt, aangezien het geen osmoregulatie heeft (DUVAL, 1925; OGLESBY, 1969; WEBER, 1971). Dit gegeven kan belangrijk zijn bij de interpretatie van waarnemingen van uitwendige sublethale verschijnselen. Verder is het hoogmoleculaire annelidehemoglobine extracellulair, zodat hemoglobine oplossingen kunnen worden bereid zonder de zuiveringsprocessen, zoals die bij cellulair hemoglobine moeten worden toegepast.



PLAAT I. Elektronen-mikroskopische foto van *A. marina* hemoglobine.
(de EM foto is gemaakt door Dr. E;F;J; van Bruggen, Groningen.)



PLAAT II. *Arenicola marina* L.

III. MATERIAAL EN METHODEN

1. Materiaal

Exemplaren van de wadworm, *Arenicola marina* L. (Annelida Polychaeta), werden verzameld van de wadvlakte (NIOZ-wad en Schorren) aan de zuid- en noord-oostkant van Texel.

2. Toxiciteitsexperimenten

De bij de toxiciteitsexperimenten gebruikte proefdieren werden in het laboratorium een etmaal in zeewater gehouden bij een temperatuur van 4°C. Dit om faeces en pseudofaeces uit te scheiden, waarna een juiste indeling van de proefdieren in gewichtsklassen gemaakt kon worden.

In statische systemen werden series experimenten naar de toxiciteit van Cu^{2+} , Zn^{2+} en H_3O^+ uitgevoerd bij een temperatuur van 15°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Ter voorkoming van bacteriële en virus-infecties werd per 3 liter gesteriliseerd zeewater 50.000 I.U. penicilline en 50 mg streptomycine toegevoegd. Het aldus verkregen medium werd gebufferd met tris-HCl buffer, pH 7,70. Voor het H_3O^+ -toxiciteitsexperiment werden de proefdieren ingezet in medium, gebufferd met tris-HCl buffer pH 6,70 en 7,10 en bistris-HCl buffer pH 6,35.

De gewenste metaalconcentraties in het medium werden verkregen door toevoegingen van standaardoplossingen (1000 ppm) van CuSO_4 en ZnSO_4 (J.T. Baker, Dilut-it). De gedoseerde concentratie per proefserie bedroeg zo 2, 10, 20, 30 of 40 ppm voor Cu^{2+} en 10, 50, 100, 150 of 200 ppm voor Zn^{2+} . Voor elke concentratie werden 2 series van 10 proefdieren ingezet,

en tevens 2 blanco-series per experiment. De hoeveelheid medium per proefdier per experimentvat bedroeg 60 of 80 ml, afhankelijk van het lichaamsgewicht van de proefdieren (60 ml voor 1-3 gram en 80 ml voor 3-5 gram).

Elke 24 uur werden de media 5 minuten belucht. Om de circa 8 uur werd gecontroleerd of er mortaliteit was opgetreden. Als criterium voor het vaststellen van de dood werd gehanteerd het niet zichtbaar contraheren van de lichaamswand als reactie op een elektrische prikkel van 10 V, toegebracht met behulp van een elektrode, aangesloten op een gelijkstroomvoeding (Philips PE 1510).

Het zeewater, waarin de dode proefdieren zich bevonden, werd gefiltreerd met behulp van een vacuum-filtratieopstelling met membraanfilters (Sartorius; 0,45 μ).

3. Anodische heroplossings voltametrie

In de gefiltreerde watermonsters werden concentraties Cu^{2+} en Zn^{2+} gemeten door middel van anodische heroplossings voltametrie (Anodic Stripping Voltammetry; ASV) (Princeton Polarographic Analyzer 374, gekoppeld aan de automatische cell sequencer 316).

Bij deze techniek wordt tussen een kwikelektrode en de oplossing een negatieve potentiaal aangebracht. Hierdoor worden metaalionen in de oplossing aan de kwikdruppel gereduceerd tot metalen, die met het kwik amalgamen vormen. Er wordt een opname van de potentiaal gemaakt, van zijn negatieve waarde, richting nul. Hierbij zullen de metalen in hun halfwaarde-potentiaalgebied geoxideerd worden en weer in oplossing gaan (stripping). Het elektronentransport dat hierbij plaatsvindt

wordt geregistreerd en is een maat voor de concentratie. Door hierna een bekende hoeveelheid metaal toe te voegen met een reagentia doseerder (Eppendorf, type 5211) en opnieuw het elektronentransport te meten, kan men door extrapolatie de concentratie bepalen (Fig. 1).

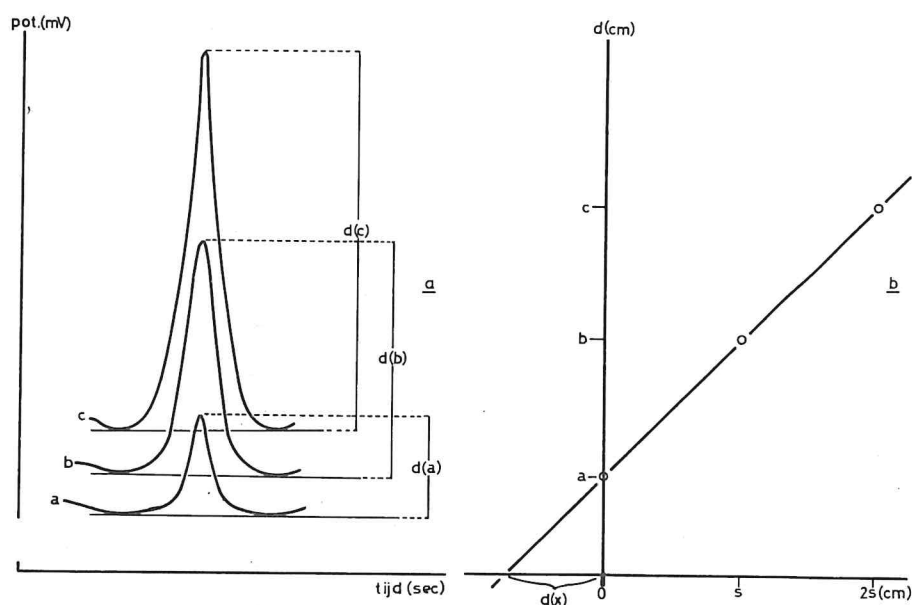


Fig. 1. Schematische voorstelling van een metaalconcentratiebepaling door middel van ASV-techniek. a: curve a: monster; curve b: monster + standaardtoevoeging (STAD); curve c: monster + 2STAD's. De hoogte van de pieken 1 t/m 3 (d) is een maat voor de concentratie metaal in oplossing. De hoogte van elke piek wordt gemeten vanaf de basislijn van elke curve. b: d wordt uitgezet tegen vaste afstanden s . De asafsnede $d(x)$ geeft na vermenigvuldiging met factor F (=verdunningsfactor $\times \frac{STAD}{S}$) de concentratie metaal in de oplossing.

Op deze manier worden alleen metaalionen en gemakkelijk dissocierbare complexen gemeten. Door aan te zuren tot een pH van circa 2, worden ook de metalen in de organische complexen vrijgemaakt voor meting.

4. Behandeling van het bloedmonster

Bloed werd verkregen door de worm aan anterior-dorsale zijde over $\pm$ 5 segmenten open te knippen, waardoor de ingewanden naar buiten stulpten. Deze werden afgespoeld en afgedroogd, waarna de bloedvaten die over het intestinum lopen werden ingeknipt en het bloed opgevangen in een door ijs gekoelde centrifugebuis. Vaste deeltjes werden gescheiden van het bloed door centrifugatie bij $2000 \times g$ gedurende 10 minuten (MSE-centrifuge). Het bloed werd door middel van ultra-dialyse door kolloïdhulsen (Sartorius, type SM 13200) bij een onderdruk van 0,5 atmosfeer bij 5°C gedurende circa 3 uur tegen een tris-HCl buffer (pH 7,0; $i = 0,05$) ontdaan van kleine moleculaire en ionogene deeltjes. Hierdoor werd een zuivere hemoglobine oplossing verkregen. De hemoglobine concentratie in deze oplossing bedroeg circa $8,2 \text{ gram Hb.} 100 \text{ ml}^{-1}$.

Voor routine metingen van de hemoglobine concentratie van de monsters die voor het zuurstofevenwicht werden gebruikt, werden de concentraties van geoxygeneerde hemoglobine oplossingen geschat met behulp van een lovibond comparator met een 0,004" cel (λ 0,1 mm) (HARRISON, 1938). De op de lovibond afgelezen waarden werden omgerekend tot hemoglobine concentraties met behulp van een calibratiecurve, waarbij lovibondwaarden zijn uitgezet tegen de concentratie, gemeten als cyanmethemoglobine (VAN KAMPEN & ZIJLSTRA, 1961).

De hemoglobine oplossingen werden tot $5,0 \text{ gram Hb.} 100 \text{ ml}^{-1}$ verdund met tris-HCl buffer (pH 7,0; 7,5; 8,1; en $i = 0,05$) en bistris-HCl buffer (pH 6,6; $i = 0,05$) en CuCl_2 - en ZnCl_2 -

oplossingen van verschillende molariteit, tot uiteindelijke concentraties Cu^{2+} en Zn^{2+} , variërend tussen $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ - $8 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, stapsgewijs steeds toenemend met een factor 10, tot een hoogste concentratie van $5 \cdot 10^{-3}$ - $8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

pH - metingen werden uitgevoerd met een gethermostreerde micro-elektrode unit met capillaire glaselektrode en calomel-elektrode (Radiometer, type E 5021a), gekoppeld aan een digitale pH/bloed-gasmonitor of een digitale acid-base analyzer (Radiometer, type PHM 73, respectievelijk type PHA 932). Alle preperatieve stappen werden uitgevoerd bij 0 - 4°C.

5. Bepaling van de hemoglobine-zuurstof evenwichtskurven

De zuurstofbindingskurven werden bepaald met behulp van de zuurstofdiffusiekamertechniek volgens NIESEL & THEWS (1961), (Fig. 2). Deze methode maakt gebruik van de verschillen in lichtdoorlaatbaarheid tussen geoxygeneerd en gedeoxygeneerd hemoglobine bij een golflengte van 436 nm. Extinktie wordt gemeten (Eppendorf fotometer 1101 M) en na linearisatie (Transformatietrap L 1853) geregistreerd (Goerz kompensatie recorder RE 511).

Uitgaande van de extinktie van volledig gedeoxygeneerd hemoglobine is de afname van de extinktie recht evenredig met de hoeveelheid geoxygeneerd hemoglobine. Een pigmentmonster wordt in een zeer dunne laag (maximale laagdikte 0,05 mm) op een glasplaatje in een afgesloten kamertje, de zogenaamde diffusiekamer, in de lichtbundel van de spektrofotometer gebracht. Door de diffusiekamer wordt nu zuivere zuurstof geleid totdat de recorder een stabiele lijn aangeeft, die overeen-

komt met 0% oxygenatie. Hierna wordt een diffusiegas (een mengsel van O_2 en N_2) toegevoerd, dat via een capillair in de kamer kan diffunderen. De zuurstofspanning (pO_2) in de kamer neemt dan vrijwel lineair met de tijd toe, zodat de O_2 -evenwichtskurve kan worden geregistreerd. De kurve wordt geijkt met de lijn die geregistreerd wordt na het doorleiden van een "ijkgas"-mengsel met een bekende samenstelling, gemaakt met behulp van een gasmengpomp (Wösthoff, type 1 M 100/a-F).

De kurve kan nu worden uitgewerkt (Fig. 3), waarbij op de tijd-as de pO_2 wordt uitgezet (door de constante papiersnelheid is dit een lineaire schaal) en de recorder-as wordt verdeeld in 0 - 100% oxygenatie. Eventuele afwijkingen, die ontstaan door het verlopen van de apparatuur en/of veranderingen in de bloeditstrijk worden grafisch gecorrigeerd.

De affiniteit van het hemoglobine voor O_2 wordt uitgedrukt als de zuurstofspanning waarbij 50% oxygenatie van het hemoglobine optreedt (p_{50}). Met behulp van een calibratiekurve, waarop de $\log p_{50}$ tegen de pH staat uitgezet, werden alle p_{50} -waarden van de monsters gecorrigeerd

IV. TOXICITEITSEXPERIMENTEN

A. Waarnemingen

Tijdens de toxiciteitsexperimenten met Cu^{2+} en Zn^{2+} werden bij de proefdieren enkele opvallende uitwendige sublethale verschijnselen waargenomen.

Bij de wadpieren in de Cu^{2+} -series trad bloedafscheiding op bij 70% van de proefdieren en bij 27% werd een langdurige (langer dan 16 uur) zwelling van de proboscis waargenomen.

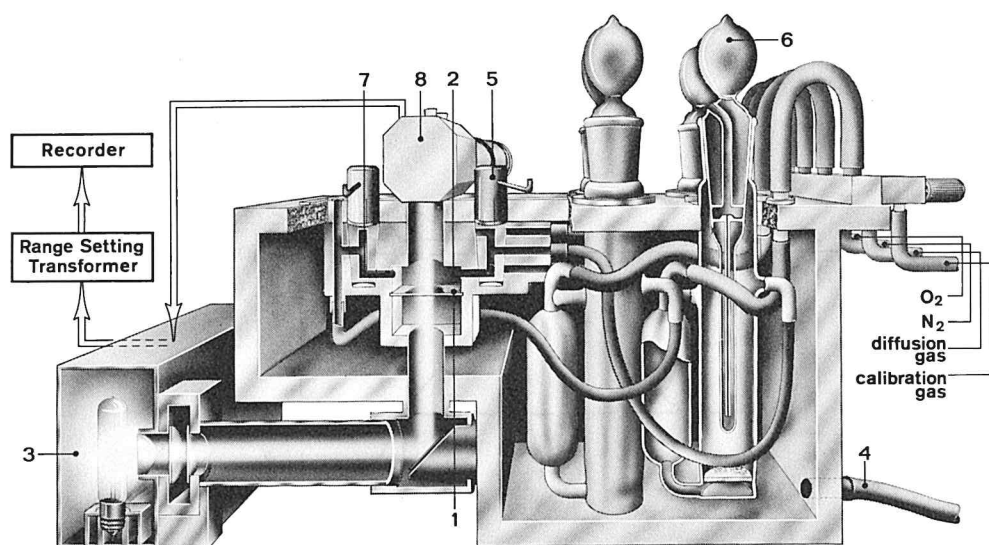


Fig.2. Lengtedoorsnede door de zuurstofdiffusiekamer. Een gelijkmatig uitstrijkje van een *Arenicola marina* hemoglobine oplossing op een object-glaasje (1) (laagdikte ca. 0,02 mm) wordt in de gaskamer (2) gebracht, zó dat een lichtstraal van 436 nm uit de lichtbron van een Eppendorf fotometer type 1102 (3) er doorheen valt. De gethermostreerde kamer (4) is uitgerust met een teflon kraan (5) voor selectieve toevoer van de gassen naar de gaskamer. De gassen die worden toegevoerd (O_2 - N_2 mengsels) passeren door ingebouwde gaswasflessen (6), om temperatuur- en waterdampevenwichten te bewerkstelligen. Na deoxygenatie door stikstof, wordt een zogenaamd diffusiegas via diffusie door een capillair (7) toegelaten. De zuurstofverzadiging van het hemoglobine monster wordt dan gemeten als lichtextinctie met behulp van een fotomultiplicatorbuis (8). De gemeten extinctie wordt gelinealiseerd door een transformatieapparaat (Eppendorf elektronische transmissie transformator, type L 1853) en geregistreerd op de y-as van een lineaire compensatie recorder (Goerz, type RE 511). (Naar: EVERAARTS, 1978).

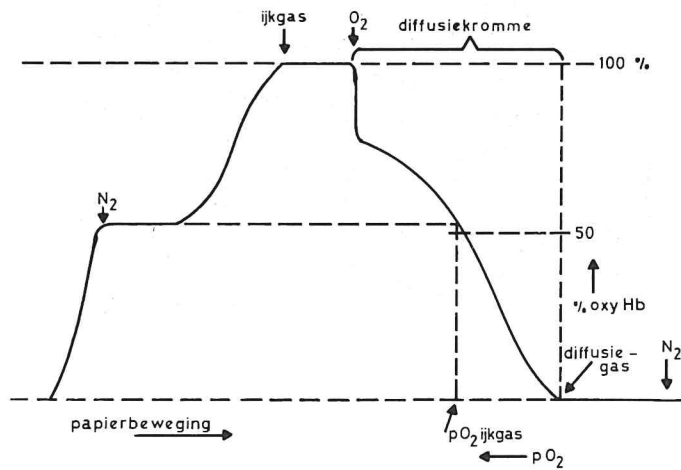


Fig.3. Uitwerking van een O_2 -curve. De getrokken lijn is de geregistreerde curve, de stippellijnen zijn hulplijnen. De pijltjes geven aan waar op een ander gas(-mengsel) werd overgegaan. Na het trekken van de horizontale hulplijnen ($N_2=0\%$ en $O_2=100\%$ oxygenatie), kan vertikaal een schaalverdeling worden gemaakt van 0-100% oxy-Hb. De verticale hulplijn wordt getrokken vanaf het snijpunt van de ijklijn met de diffusiekromme. Nu kan met behulp van deze lijn een schaalverdeling voor pO_2 gemaakt worden, zodat voor elke pO_2 het percentage oxy-Hb kan worden afgelezen, en andersom.

Verder ook afscheidingen van slijm met donkergroene tot zwarte partikels en zwellingen van de voorste segmenten.

Bij de proefdieren in het Zn^{2+} -medium werden minder bloedingen (25%) en langdurige zwelling van de proboscis (4%) waargenomen. Slijmafscheiding kwam in slechts een paar gevallen voor in minieme hoeveelheden. Direct na het inzetten van de proefdieren in het medium werd bij de hogere concentraties (150 ppm Zn^{2+} en meer) een sterke lichaamsafscheiding van gele vloeistof waargenomen.

Een algemene observatie was de neiging tot afsnoering van het achterlijf.

B. Resultaten

De duur van het Cu^{2+} -toxiciteitsexperiment bedroeg 159 uur. Gedurende deze tijd was er geen mortaliteit binnen de series proefdieren in blanco milieu. Er vond in de loop van het experiment een daling van de pH plaats van 7,66 tot 6,90. De duur van het Zn^{2+} -toxiciteitsexperiment bedroeg 186 uur, waarbij geen mortaliteit bij de wadwormen in het blanco milieu optrad. De pH daalde in de loop van het experiment van 7,40 tot 7,00.

Bij toenemende concentratie Cu^{2+} daalde de overlevingstijd van de proefdieren, waarbij slechts geringe verschillen optraden tussen de overlevingsduur van dieren uit de 2 gewichtsklassen (Fig. 4a en b). Een verhoging van de Zn^{2+} -concentratie veroorzaakte eveneens een verhoging van de mortaliteit, waarbij geen significante verschillen aangetoond konden worden tussen de 2 gewichtsklassen van de proefdieren (Fig. 4c en d).

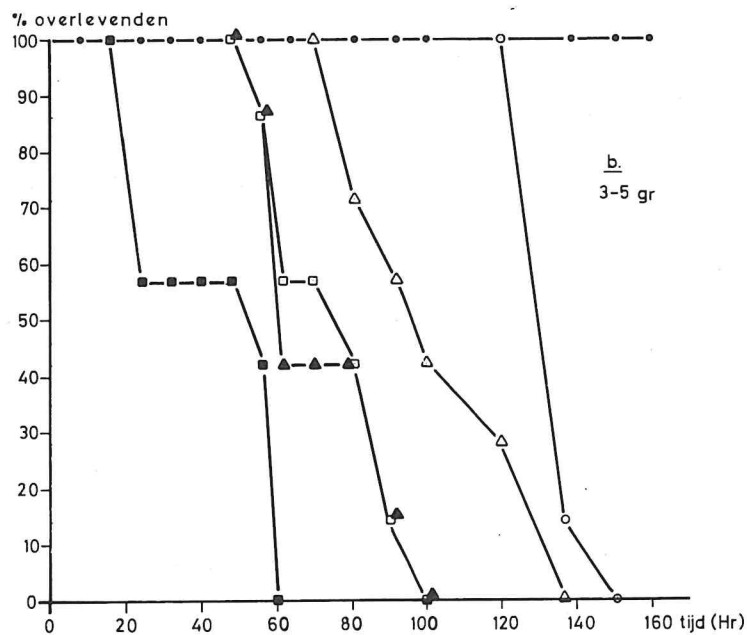
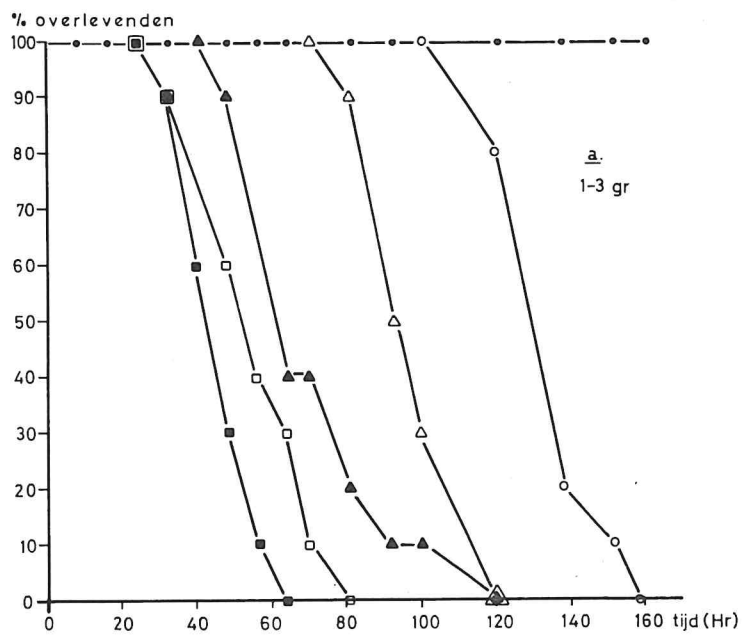


Fig. 4a en b. Percentage overlevende proefdieren op verschillende tijdstippen van de proefduur (tot 200 uur) bij concentraties gedoseerd Cu^{2+} in het medium van 0 ppm (●), 2 ppm (○), 10 ppm (△), 20 ppm (▲), 30 ppm (◻) of 40 ppm (■).

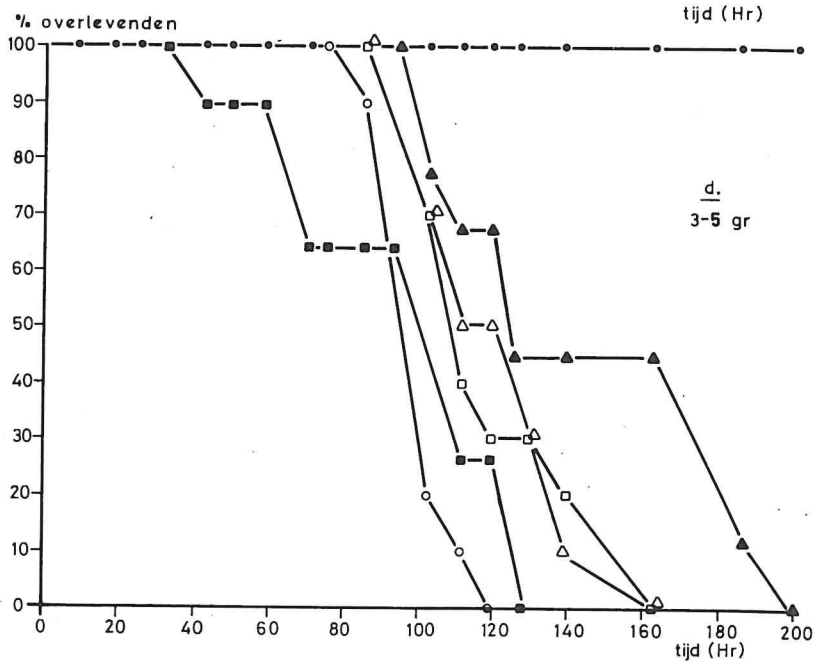
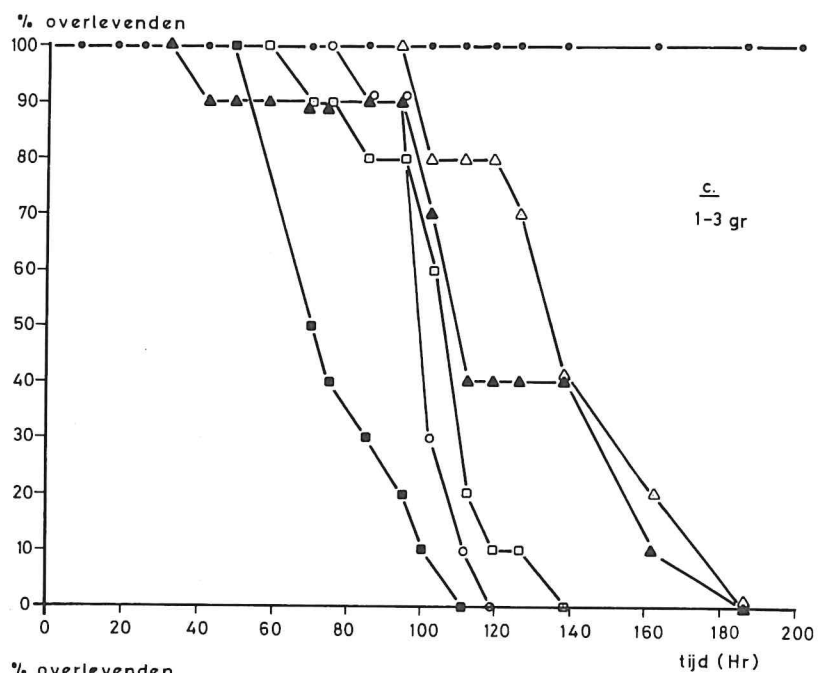


Fig. 4c en d. Percentage overlevende proefdieren op verschillende tijdstippen van de proefduur (tot 200 uur) bij concentraties gedoseerd Zn^{2+} in het medium van 0 ppm (●), 10 ppm (○), 50 ppm (△), 100 ppm (▲), 150 ppm (◻) of 200 ppm (■).

Uit Fig. 4 kunnen de tijden, waarbij 50% van de dieren bij een bepaalde dosis Cu^{2+} of Zn^{2+} gestorven waren (Lt_{50}) worden afgeleid (Tabel I).

Tabel I
Aan het medium gedoseerde hoeveelheden Cu^{2+} en Zn^{2+} en de Lt_{50} -waarden voor *A. marina* in de gewichtsklassen 1-3 g (a) en 3-5 g (b).

gedoseerde hoeveelheden Cu^{2+} (ppm)	Lt_{50} (Hr)		gedoseerde hoeveelheden Zn^{2+} (ppm)	Lt_{50} (Hr)	
	a	b		a	b
0	n.v.t.	n.v.t.	0	n.v.t.	n.v.t.
2	128,0	129,5	10	101	98
10	91,3	96,0	50	133	116
20	61,3	62,5	100	109	124
30	51,3	76,0	150	106	109
40	42,5	52,0	200	71	100

Na meting door middel van ASV van de concentraties Cu^{2+} en Zn^{2+} in het medium, na beëindiging van het experiment, werd een correlatie tussen gedoseerde- en gemeten metaalconcentratie in de oplossing gevonden (Fig. 5). Deze geeft aan dat niet al het gedoseerde metaal wordt teruggevonden in het medium.

De relatie tussen werkelijk in het medium heersende concentraties Cu^{2+} en Zn^{2+} en de Lt_{50} -waarden zijn weergegeven in Fig. 6. Bij een toename van de gemeten concentratie metaal treedt een daling op van de Lt_{50} -waarden, die met name in het lagere concentratiegebied (1-5 ppm voor Cu^{2+} en 5-20 ppm voor Zn^{2+}) sterk is.

Door interpolatie werden de concentraties Cu^{2+} en Zn^{2+} waarbij na 96 uur 50% van de proefdieren dood was (Lc_{50} - 96 hr) verkregen. Deze waarden zijn 1,6 ppm voor Cu^{2+} en 136 ppm voor Zn^{2+} .

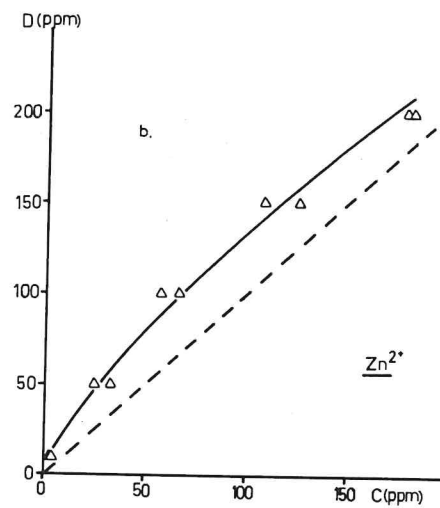
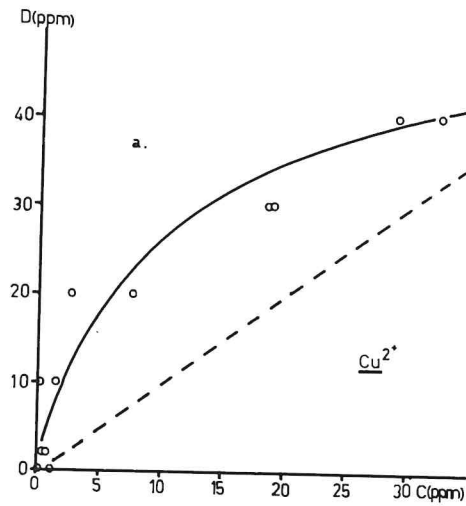


Fig.5. Relatie tussen gedoseerde hoeveelheden (D) Cu^{2+} (a) en Zn^{2+} (b) en met ASV gemeten concentraties (C) Cu^{2+} en Zn^{2+} . Gestippelde lijn illustreert het hypothetische geval $D = \frac{C}{0.76}$ (N=12, correlatiefactor, $r=0.99$).
Regressielijn voor Zn^{2+} is: $C=3.98D$

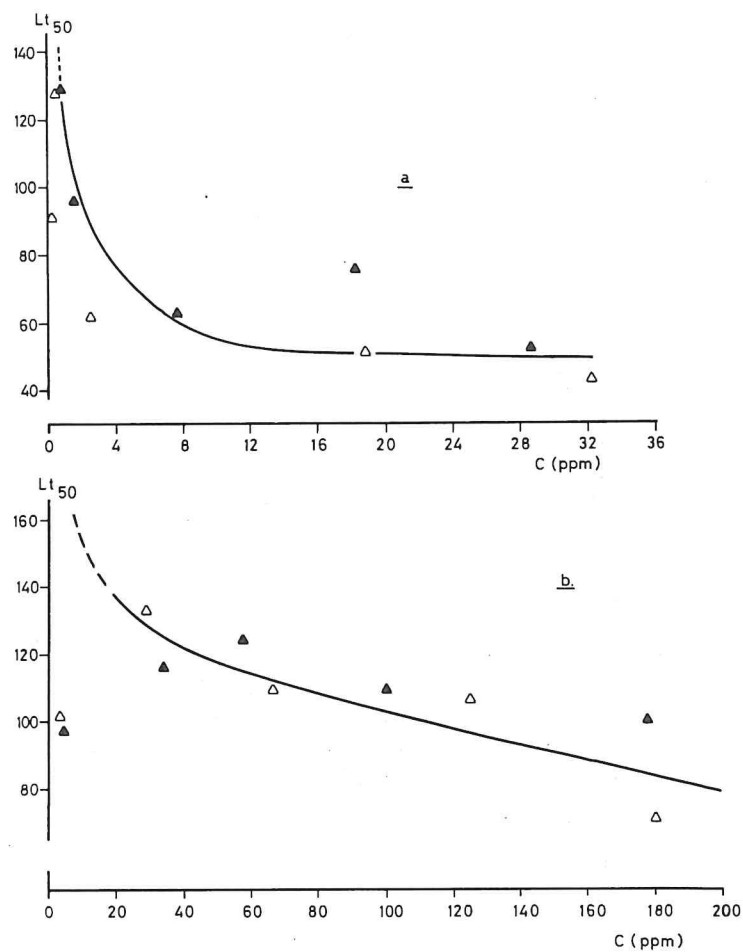


Fig. 6. Relatie tussen de Lt_{50} -waarden en de gemiddelde, met ASV gemeten concentraties (C) Cu^{2+} (a) en Zn^{2+} (b) in de media van *ARENICOLA* van de gewichtsklassen 1-3 g (Δ) en 3-5 g ($\blacktriangle$).

Tijdens het H_3O^+ -toxiciteitsexperiment trad, onder de gegeven omstandigheden, over de gehele duur van 200 uur geen mortaliteit of zichtbare sublethale effecten op. De pH's fluctueerden van 7,18 tot 7,01 in het medium, gebufferd met tris-HCl pH 7,10; van 6,72 tot 6,64 in het medium, gebufferd met bistris-HCl pH 6,70 en van 6,77 tot 6,31 in medium, gebufferd met bistris-HCl pH 6,35 (Fig. 7).

C. Discussie

Het opzwellen van de proboscis, de bloedingen en het af-snoeren van het achterlijf van *Arenicola marina* tijdens de toxiciteitsexperimenten, zijn tekenen die wijzen op het slecht functioneren van de fysiologische mechanismen. De slijmafscheiding zou een afweermechanisme kunnen zijn tegen milieuvloeden.

De donkergroene tot zwarte partikels die ingebed liggen in het slijm, zouden de volgende stoffen kunnen zijn:

- a. Een neerslag van het donkergroene pigment arenicochroom (VAN DUYN, 1951; KRUGER, 1971).
- b. Afbraakprodukten van het hemoglobine (ROCHE, 1961; KRUGER, 1971).
- c. Elementair zwavel dat ontstaat door middel van een reactie tussen hemoglobine en zwavelwaterstof, waarbij de worm de mogelijkheid bezit om de zwavelwaterstof te oxyderen en elementair zwavel af te scheiden (PATEL & SPENCER, 1963; KRUGER, 1971).
- d. Een neerslag van een koperzout (bijvoorbeeld CuS).

De sterke afscheiding van gele vloeistof door de wadpier bij het Zn^{2+} -toxiciteitsexperiment zou een directe reactie

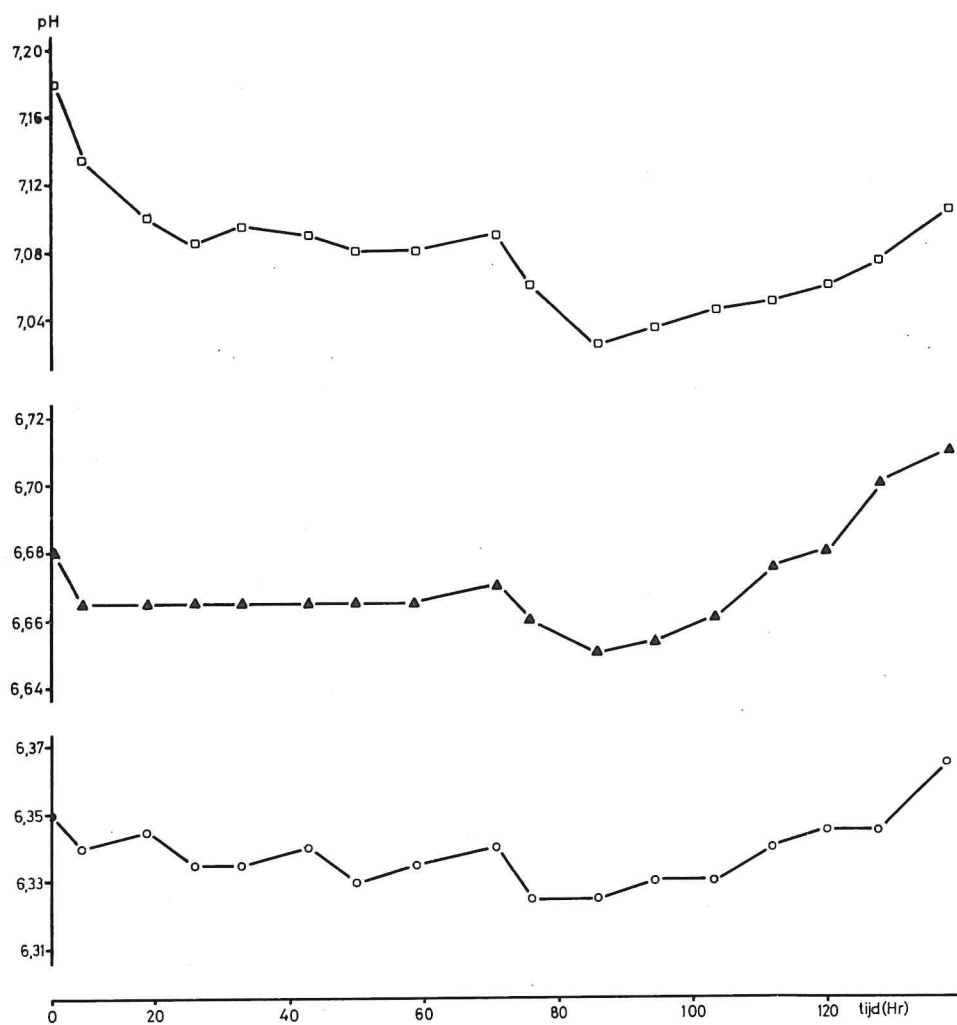


Fig. 7. Relatie tussen gemiddelde pH-waarden van de media van de beide gewichtsklassen *Arenicola* en de tijd. Verloop van de pH van de media, gebufferd met tris-HCl pH 7,18 (□), bistris-HCl pH 6,68 (▲) en bistris-HCl pH 6,34 (○).

kunnen zijn op het medium, waarbij het arenicochroom uit de epitheel laag naar buiten diffundeert.

Er blijkt een verschil van een factor 85 tussen de Lc_{50} (96 hr, $15^{\circ}C$)-waarden van Cu^{2+} en Zn^{2+} voor *Arenicola marina* te bestaan. BRYAN (1974) vond bij experimenten met *Nereis diversicolor* in sediment een Lc_{50} (96 hr, $13^{\circ}C$)-waarde van 0,54 voor Cu^{2+} en 55 voor Zn^{2+} . Deze Lc_{50} -waarden verschillen een factor 102, wat in dezelfde orde van grootte ligt als bij de Lc_{50} -waarden van Cu^{2+} en Zn^{2+} voor *Arenicola marina*. Het verschil in toxiciteit van de metalen Cu^{2+} en Zn^{2+} bij *Arenicola marina* zou te wijten kunnen zijn aan een mogelijkheid tot sterke regulatie van Zn^{2+} en het niet kunnen reguleren van Cu^{2+} door het organisme, zoals is gevonden bij *Nereis diversicolor* (BRYAN & HUMMERSTONE, 1971 en 1973).

Aangezien bij de proefdieren in blanco milieu gedurende het gehele experiment geen mortaliteit optrad, lijkt de sterke daling (geëxtrapoleerd en als onderbroken lijn getekend in Fig. 6) van de Lt_{50} -waarden bij de laagste concentraties toxicant juist. Verder toxiciteitsonderzoek met *Arenicola marina* met toegevoegde concentraties Cu^{2+} van 0 - 4 ppm en Zn^{2+} van 0 - 40 ppm zou zekerheid kunnen geven over het verloop van de Lt_{50} -waarden in dit gebied.

Er bleken bij *Arenicola marina* geen significante verschillen te bestaan tussen de mortaliteit als gevolg van intoxicatie door Cu^{2+} en Zn^{2+} tussen de gewichtsklassen 1 - 3 gram en 3 - 5 gram, gedurende de duur van het experiment. Hieruit mag geconcludeerd worden dat onder de gegeven omstandigheden de grootte van de organismen geen invloed had op de effecten van de toxische metalen Cu^{2+} en Zn^{2+} .

Een verklaring voor de iets grotere pH-fluctuatie in de pH-serie 7,18 zou kunnen zijn, dat gebufferd was met een tris-HCl buffer pH 7,18, die een bufferende werking heeft in het gebied pH 7 - 8. pH 7,8 ligt dus aan de rand van het bufferende gebied.

Verondersteld mag worden dat de H_3O^+ -aktiviteit niet van invloed is geweest op de mortaliteit van de proefdieren tijdens de toxiciteitsexperimenten van Cu^{2+} en Zn^{2+} . In combinatie met een zwaar metaal blijkt de H_3O^+ -aktiviteit echter van invloed te kunnen zijn op de toxiciteit van dit metaal (HOWARTH & SPRAGUE, 1978; WAIWOOD & BEAMISH, 1978b).

WAIWOOD & BEAMISH (1978a) vonden dat bij de regenboogforel een verhoging van de pH van 6,0 naar 8,0 een verhoging van de Lc_{20} (96 hr)-waarde voor Cu^{2+} van $\pm 125 \mu\text{g.l}^{-1}$ naar $\pm 325 \mu\text{g.l}^{-1}$ (verlaging van de toxiciteit met een factor 2,6) tot gevolg had. Als bij het toxiciteitsexperiment met *Arenicola*, waarbij een verlaging van de pH van 7,66 naar 6,90 optreedt, een zelfde gecombineerd effect heeft plaatsgevonden, zou dat een verhoging van de toxiciteit van Cu^{2+} in de loop van het experiment tot gevolg hebben gehad. Alleen rekening houdend met het effect van Cu^{2+} , zal de Lc_{50} (96 hr)-waarde voor Cu^{2+} bij het optreden van een dergelijk gecombineerd effect dan ook hoger liggen dan de gevonden waarde van 1,6 ppm.

Ook gecombineerde effecten met saliniteit en temperatuur blijken invloed te hebben op de toxiciteit van zware metalen (JONES, 1973; MCKENNEY & NEFF, 1979; THEEDE, SCHOLTZ & FISHER, 1979).

V. INVLOED VAN KOPER EN ZINK OP DE ZUURSTOF- BINDENDE EIGENSCHAPPEN VAN HET HEMOGLOBINE

A. Resultaten

1. Zuurstofaffiniteit

De zuurstofbindingskurven van het hemoglobine van de wadworm *Arenicola marina* geven een zeer hoge O_2 -affiniteit van het hemoglobine te zien. Bij pH 7,0 heeft het zuivere *Arenicola* hemoglobine een p_{50} van circa 1,7 mm Hg (Fig. 8). Uit Fig. 8 blijkt een geringe afname van de zuurstofaffiniteit (een toename van de $\log p_{50}$) bij een toenemende kationenconcentratie (Cu^{2+} of Zn^{2+}) in het concentratiegebied van $5 \cdot 10^{-7}$ tot $5 \cdot 10^{-3}$ M bij lagere pH-waarden (6,6 respectievelijk 7,0). Voor Cu^{2+} is dit effect meer uitgesproken dan voor Zn^{2+} (vgl. Fig. 8a en b). Bij hogere pH-waarden (7,5 respectievelijk 8,1) vindt weer een verhoging van de affiniteit plaats (verlaging $\log p_{50}$) bij concentraties Cu^{2+} en Zn^{2+} groter dan $5 \cdot 10^{-4}$ M. Dit geldt zowel voor Cu^{2+} als Zn^{2+} .

2. Bohr effect

Als maat voor de invloed van de pH op de O_2 -affiniteit (het Bohr effect) wordt de Bohr-index gebruikt:

$$\text{Bohr-index, } \Phi = \frac{\Delta \log p_{50}}{\Delta \text{pH}}.$$

Bij de toenemende concentraties Cu^{2+} en Zn^{2+} treedt een aanzienlijke afname van het Bohr effect op; de Bohr-index be-

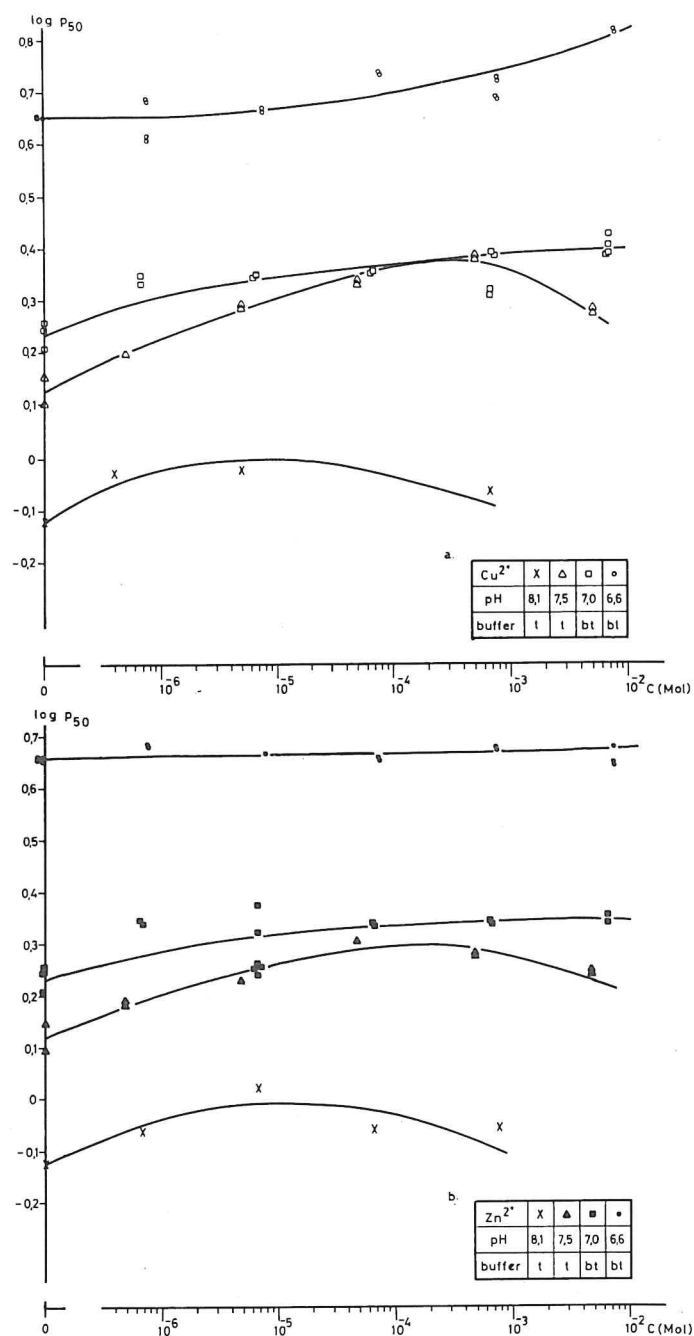


Fig. 8 . De invloed van Cu^{2+} (a) en Zn^{2+} (b) op de zuurstofaffiniteit van hemoglobine van *A. marina*, bij verschillende pH-waarden. Tris-HCl (t) buffers en bistris (bt) buffers, $I = 0,05$, $T = 15^{\circ}\text{C}$.

draagt circa -0,60 voor zuiver *Arenicola* hemoglobine en circa -0,40 voor hemoglobine oplossingen met $5 \cdot 10^{-4}$ M Cu^{2+} of Zn^{2+} (Fig. 9).

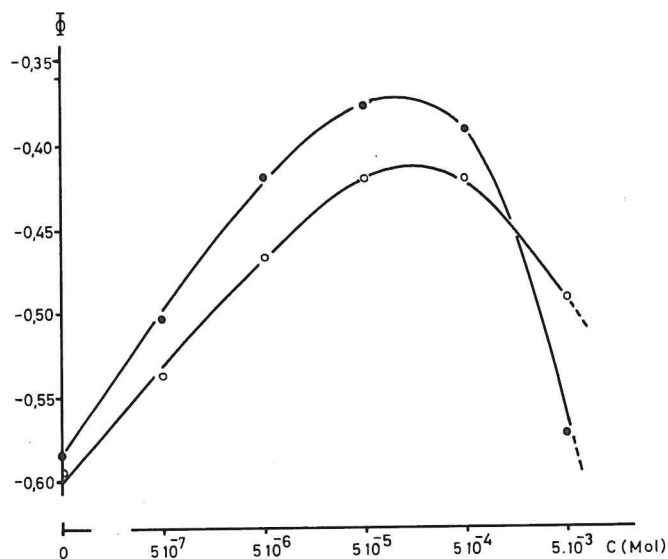


Fig. 9 . Invloed van Cu^{2+} (●) en Zn^{2+} (○) op de Bohr factor

$$\phi = \frac{\Delta \log p50}{\Delta \text{pH}},$$

bij *Arenicola marina* hemoglobine. Tris-HCl buffers; $I = 0,05$; $T = 15^{\circ}\text{C}$; pH 6,60 tot 7,50.

B. Discussie

Het maken van de O_2 -diffusiecurves van *Arenicola* hemoglobine, waarvan de concentratie Cu^{2+} of Zn^{2+} $5 \cdot 10^{-3}$ M bedroeg, werd bij alle gebruikte pH omstandigheden bemoeilijkt door lichte denaturatie van het hemoglobine gedurende het experi-

ment. Bij een concentratie van $5 \cdot 10^{-2}$ M Cu^{2+} of Zn^{2+} in een oplossing van *Arenicola marina* hemoglobine vond volledige denaturatie van het hemoglobine plaats (bruine klontering).

Over het gehele concentratiegebied van $5 \cdot 10^{-7}$ tot $5 \cdot 10^{-3}$ M heeft Zn^{2+} bij pH 6,6 nauwelijks invloed op de p_{50} van het *Arenicola* hemoglobine (Fig. 8). Gezien het verloop van de lijnen in Fig. 8a bij pH 6,6 en 7,0, mag verondersteld worden dat ergens tussen pH 6,6 en 7,0 een pH-waarde ligt, waarbij de p_{50} -waarde van *Arenicola* hemoglobine met concentraties Cu^{2+} van $5 \cdot 10^{-7}$ tot $5 \cdot 10^{-3}$ M nauwelijks zal variëren. De p_{50} -waarden voor zuiver *Arenicola* hemoglobine is verschillend bij verschillende pH's (0,74 mm Hg bij pH 8,1 tot 4,57 mm Hg bij pH 6,6; Bohr effect).

Het Bohr effect ontstaat door interactie tussen de heemgroepen, waaraan het zuurstof wordt gebonden en de H_3O^+ -specifieke bindingsplaatsen op de eiwitketens van het hemoglobine. Onderlinge afhankelijkheid van de reaktieconstanten van twee of meer specifieke bindingsplaatsen voor stoffen op het hemoglobine proteïne, noemt men "linked functions" (WYMAN, 1948; ROSSI-FANELLI et al, 1964). Zo is de interactie van H^+ met een specifieke plaats op de eiwitketen ook een "linked function" (BENESH & BENESH, 1961). Deze interactie veroorzaakt veranderingen in de zuurstofaffiniteit van de heemgroep (het zogenaamde Bohr effect).

De Bohr-faktor, Φ , wordt duidelijk beïnvloed door de concentraties Cu^{2+} en Zn^{2+} in het hemoglobine (Fig. 9), wat wijst op het mogelijk optreden van "heterotrope interacties" (Fig. 10). Het zou mogelijk zijn dat Cu^{2+} en Zn^{2+} zich aan de kationen-specifieke bindingsplaats (Fig. 10) binden en door

"heterotrope interacties" de zuurstofaffiniteit van het hemoglobine van *Arenicola marina* beïnvloedt.

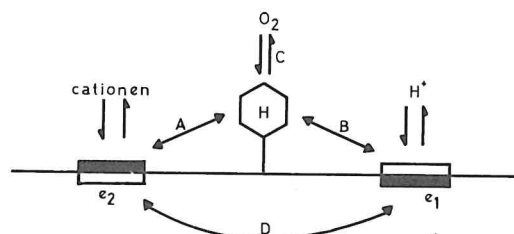


Fig. 10. Schematische voorstelling "heterotropic interaction".

(B): linked function tussen heemgroep (H) en de proton-specifieke bindingsplaats (e_1) op de eiwitketen van het hemoglobine.

(A): linked function tussen heemgroep (H) en een mogelijke cationen-specifieke bindingsplaats (e_2) op de eiwitketen van het hemoglobine. Beide linked functions beïnvloeden ook elkaar (D, "heterotropic interaction").

Samenvattend blijkt uit de resultaten een verlaging van de zuurstofaffiniteit van het hemoglobine op te treden bij toenemende metaalconcentraties (Fig. 8).

Dit houdt voor het organisme in, dat het minder makkelijk zuurstof uit zeewater kan opnemen en binden. Tevens zien we een afname van het Bohr effect (Fig. 9), welk van invloed is op de afgifte van zuurstof aan de weefsels in het organisme. De zuurstofafgifte aan de weefsels zal minder gemakkelijk gaan bij een afnemend Bohr effect. Een verhoging van de metaalconcentratie heeft dus een dubbel negatief effect op *Arenicola marina* L. Zowel een minder goede zuurstofbinding aan het hemoglobine, als een verlaagde afgifte van zuurstof aan de weefsels, bij de daar heersende zuurgraad.

Bij het droogvallen van het wad treedt geen doorstroming meer op van zeewater in de woonbuis van *A. marina*. Hierdoor treedt een verlaging van het zuurstofgehalte in het zeewater in de woonbuis op. VAN DAM (1938) vond dat het aantal en de

intensiteit van de adembewegingen afnam bij een afnemend zuurstofgehalte. Dit effect plus bovengenoemde effecten zullen als geheel dus zeer nadelig inwerken op het organisme.

De grote verschillen tussen de Lc_{50} -waarden van Cu^{2+} en Zn^{2+} voor *Arenicola* en de kleine verschillen in de zuurstof-affiniteit en de Bohr-faktor van *Arenicola* hemoglobine met toegevoegd Cu^{2+} en Zn^{2+} kunnen een indicatie zijn van de mogelijkheid tot Zn^{2+} -regulatie bij de wadpier en de afwezigheid van de mogelijkheid tot Cu^{2+} -regulatie.

VI REFERENTIES

- BARCROFT, J. & M. CAMIS, 1909. The dissociation curve of blood. J. Physiol. 39: 118-142.
- BARCROFT, J. & F. ROBERTS, 1909. The dissociation curve of blood. J. Physiol. 39: 143-148.
- BENESCH, R.E. & R. BENESCH, 1961. The chemistry of the Bohr effect, I. The reaction of N-ethyl maleimide with the oxygen linked acidgroups of haemoglobin. J. Biol. Chem. 236(2): 405-410.
- BRYAN, G.W., 1974. Adaptation of an estuarine polychaete to sediments containing high concentrations of heavy metals. In: Pollution and physiology of marine organisms. Eds. Vernberg, F.J. and W.B. Vernberg Academic Press, New York/London: 123-135.
- BRYAN, G.W. & L.G. HUMMERSTONE, 1971. Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of heavy metals, I. General observations and adaptation to copper. J. Mar. Ass. U.K. 51: 845-863.
- , 1973. Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to manganese in estuarine sediments. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 51: 859-872.
- DAM, L. VAN, 1938. On the utilisation of oxygen and regulation of breathing in some aquatic animals. Thesis, Groningen University: 96-97.
- DUVAL, M., 1925. Modification sur l'influence du milieu extérieur. Annal. Instit. Océanogr. (Monaco) 8: 232-407.
- DUYN, P. VAN, E. HARINGA & G.O.E. LIGNAC, 1951. Arenicochrome, a new pigment from *Arenicola*. Experientia 7: 376-377.
- EVERAARTS, J.M., 1971. De invloed van elektrolyten op de functionele en structurele eigenschappen van haemoglobine van *Arenicola Marina* L. NIOZ publikaties en verslagen 1971(3): 2-46.
- , 1978. The haemoglobin of the herring, *Clupea harengus*. Neth. J. Sea Res. 12: 1-57.
- EVERAARTS, J.M., & R.E. WEBER, 1974. Effects of inorganic anions and cations on oxygen binding of haemoglobin from *Arenicola marina* (polychaeta). Comp. Biochem. Physiol. 48A: 509-520.

- FLORKIN, M.C., 1969. Respiratory proteins and oxygen transport. In: Chemical Zoology: Annelida, Echiura and Sipuncula. Eds. Florin, M.C. & B.T. Scheer Academic Press, New York, 4: 111-162.
- HARRISON, G.A., 1938. Estimation of haemoglobin in undiluted blood, using a Lovibond comparator. Lancet 235: 621-622.
- HOWARTH, R.S. & J.B. SPRAGUE, 1978. Copper lethality to Rainbow trout in waters of various hardness and pH. Water Research 12(7) 455-463.
- JONES, M.B., 1973. Influence of salinity and temperature on the toxicity of mercury to marine and brackish water isopods (Crustacea). Est. Coast. Mar. Sc. 1(4): 425-433.
- KAMPEN, E.J. VAN & W.G. ZIJLSTRA, 1961. Standardization of haemoglobinometry. II. The haemoglobincyanide method. Clinica Chim. Acta 6: 538-544.
- KARLSON, P., 1964. Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 151-159.
- McKENNEY, C.L., jr. & J.M. NEFF, 1979. Individual effects and interactions of salinity, temperature, and zinc on larval development of the Grass shrimp *Palaemonetes pugio*. I. Survival and development during metamorphosis. Mar. Biol. 52: 177-188.
- KRUGER, F., 1971. Bau und leben des Wattwurmes *Arenicola marina*. Helgoländer Wiss. Meeresunters. 22(2): 149-200.
- LEVIN, O., 1963. Electron-microscope observations on some 60 S erythrocytins and their split products. J. Molec. Biol. 6: 95-101.
- NIESEL, W. & G. THEWS, 1961. Ein neues Verfahren zur schnellen und genauen Aufnahme der Sauerstoffbindungskurve des Blutes und Konzentrierter Hämoproteidlösungen. Pflüger Arch. ges. Physiol. 273(4): 380-395.
- OGLESBY, L.C., 1969. Salinity-stress and desiccation in intertidal worms. Am. Zool. 9: 319-331.
- PATEL, S. & C.P. SPENCER, 1963. The oxydation of sulphide by means of haem compounds from the blood of *Arenicola marina*. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 43: 167-176.
- RASMUSSEN, K.K. & R.E. WEBER, 1979. Respiratory properties of erythrocytins (extracellular hemoglobin) in the blood of the annelid *Arenicola marina* with special reference to the influences of salinity and temperature. Ophelia 18(2): 151-170.
- ROCHE, J., 1961. Mise en évidence de molécules d'hémoglobine et de ferritine dans certaines cellules d'*Arenicola marina*. C. r. hebdomadaire Acad. Sci., Paris 252: 3886-3887.
- , 1965. Electron-microscope studies on high molecular weight erythrocytins (invertebrate haemoglobins) and chlorocytins of annelids. In: Studies in Comparative Biochemistry. Ed. Munday, K.A. Pergamon Press, London Vol. 23: 62-80.
- ROCHE, J., M. BESSIS & J.P. THIERY, 1960. Etude de l'hémoglobine plasmique de quelques Annelides au microscope électronique. Biochim. biophys. Acta 41: 182-184.
- ROSSI-FANELLI, A., E. ANTONINI & A. CAPUTO, 1964. Hemoglobin and myoglobin. In: Advances in Protein Chemistry. Eds. Anfinsen, C.B., jr., M.L. Anson, J.T. Edsall & F.M. Richards Academic Press, New York/London Vol. 19: 74-222.

- SICK, H. & K. GERSONDE, 1969. Method for continuous registration of O₂-binding curves of haemoproteins by means of a diffusion chamber. *Analyt. Biochem.* 32: 326-376.
- THEEDE, H., N. SCHOLTZ & H. FISCHER, 1979. Temperature and salinity effects on the acute toxicity of cadmium to *Laomedea loveni* (Hydrozoa). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1: 13-19.
- WAXMAN, L., 1971. The haemoglobin of *Arenicola cristata*. *J. biol. Chem.* 246: 7318-7327.
- WAIWOOD, K.G. & F.W. BEAMISISH, 1978a. Effects of copper, pH and hardness on the critical swimming performance of Rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson). *Water Research* 12: 611-619.
- , 1978b. The effect of copper, hardness and pH on the growth of Rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish. Biol.* 13: 591-598.
- WEBER, R.E., 1970. Relations between functional and molecular properties of annelid haemoglobins. Interaction between haems in the haemoglobin of *Arenicola marina* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 35: 179-189.
- , 1972. Over de inwerking van enkele milieufactoren op de functie van haemoglobine bij wadpieren. *Meded. Hydr. biol. Ver.* 5(2): 109-111.
- , 1972. On the variation in oxygen-binding properties of haemoglobins in lugworms (Arenicolidae, Polychaeta). *Proc. Vth Eur. Mar. Biol. Symp. Venice, October 1970. Publ. M. Piccin, Padova*: 231-243.
- WEICHELMAN, K.J. & J. PARKHURST, 1972. Kinetics of ligand binding in the hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. *Biochemistry* 11: 4515-4520.
- WYMAN, J. jr., 1948. Heme Proteins. In: *Advances in protein chemistry*. Eds. Anson, M.L. & J.T. Edsall Academic Press, New York IV: 410-531.