

All rights reserved

Internal reports are not to be reprinted or cited, it is only allowed by consent of the Netherlands Institute For Sea Research.

printed by  texel

ENKELE BIOCHEMISCHE PARAMETERS TER BEPALING VAN DE INVLOED VAN DE VOEDINGSWIJZE VAN ARENICOLA MARINA OP DE WADBODEM*

door

P.M. de JONG

INHOUD

1. Summary en Samenvatting	1-2
2. Inleiding	3
3. Materiaal en methoden	9
3.1. Monsternamen	9
3.2. Ontwikkeling van de ATP meting	9
3.3. ATP meting	13
3.4. ETS meting	14
3.5. Chlorofyl a meting	14
3.6. Respiratiemeting m.b.v. de Gilson respirometer	15
3.7. Energy Charge bepaling	15
3.8. Bepaling van het ATP-gehalte van sulfaat-reducerende bacteriën	16
4. Experimenten en resultaten	16
4.1. I Beschrijving van een profiel van de wadbodem bij de NIOZ-haven	16
4.2. Methodes	16
4.3. Resultaten	17
4.4. II Beschrijving van enkele biochemische parameters in en om de woonbuis van de wadpier	23
4.5. Methodes	23
4.6. Resultaten	24
5. Discussie	29
6. Bijlage, of haken en voetangels	34
7. Suggesties voor verder onderzoek	36
8. Literatuurlijst	37

I. SUMMARY

Vertical distribution of some biochemical parameters - ATP, ETS, chlorophyl a, respiration and energy charge - was studied

* Intern verslag over werk verricht als doctoraal studie in de Biologie voor de Universiteit te Utrecht bij dr. J.J. Zijlstra in het tijdvak augustus 1981 tot februari 1982 aan het NIOZ te Texel, onder leiding van J.H. Vosjan.

in a tidal flat of the Dutch Waddensea and in an artificial system for the purpose of describing these parameters in and around the dwelling tube of *Arenicola marina*.

It is shown that in general the concentrations of ATP and chlorophyll a, and the activity of the electron transport and respiration as well decline with depth.

Significant higher levels of ATP were found in the dwelling tube, both at the funnel side (between 7-15 cm depth) and at the excretion side. This enrichment of biomass might be explained by biomass rich surface sediment moving down the funnel or by better growth conditions for micro-organisms in the wall of the dwelling tube, as a result of the combination of oxygen supply and organic matter rich sediment.

SAMENVATTING

De verticale distributie van enkele biochemische parameters nl. ATP, ETS, chlorofyl a, respiratie en E.C. werden bestudeerd in een natuurlijk wad en in een experimentele opstelling, waarbij metingen in en om de woonbuis van de wadpier, *Arenicola marina*, werden uitgevoerd.

De distributie van ATP en chlorofyl a vertoont i.h.a. evenals de ETS-activiteit en de respiratie een afname in de verticaal. In de woonbuis van de wadpier wordt aan de trechterzijde tussen 7-15 cm diepte en aan de poephoopzijde in de hele buis een significante verrijking aan ATP gevonden t.o.v. het wadsediment.

Dit betekent een verrijking van biomassa of door het naar beneden schuiven van rijk oppervlakte sediment en/of door een verbeterde groei van micro-organismen in de wand van de woonbuis door een combinatie van organische stof rijk sediment en O₂-toevoer.

2. INLEIDING

De wadpier, *Arenicola marina*, is een vertegenwoordiger van de familie van de Arenicolidae welke behoort tot de klasse Polychaeta of borstelwormen. Het is een algemeen voorkomende worm op de wadden van de Nederlandse Waddenzee en vertegenwoordigt 20% van de totale macrozoobenthos biomassa (BEUKEMA 1976). De grootste populatie dichtheden worden gevonden halfweg hoog- en laagwaterniveau in bodems met een intermediair slibgehalte van ca. 4-10% (BEUKEMA & de VLAS 1979). Door zijn ondergrondse levenswijze en door de grote dichtheden waarin het dier in het wad kan voorkomen, is de wadpier van groot belang voor de omwoeling (bioturbatie) van de bovenste 20 tot 30 cm van de wadbodem (VAN STRAATEN 1952, CADÉE 1976). Dit heeft als gevolg dat organische stof rijk sediment naar diepere lagen in de wadbodem wordt getransporteerd waar dit eventueel verder gemineraliseerd kan worden.

De woonbuis van de wadpier wordt i.h.a. beschreven als een U-vormige buis. De bouw van de buis aan trechter- en poephoopzijde is echter verschillend (Fig. 1) (WELLS 1945, KRÜGER 1971). Aan de startzijde eindigt de buis in een poephoop terwijl de wand gekenmerkt wordt door een laagje geoxideerd sediment welk aan elkaar is gekit met mucus (TRUEMAN & ANSELL 1969). Aan de kopzijde eindigt deze gang blind. Aan de kopzijde wordt de woon-"buis" gekenmerkt door een trechter aan het oppervlak waaronder een geoxideerde drijfzand kolom van oppervlakte sediment ligt. Deze reikt tot de mond van de pier (WELLS 1945).

JAKOBSEN (1967) heeft aangetoond dat het zand uit kolom in 3 tot 6 uur naar de poephoop wordt getransporteerd. Dit komt overeen met de gegevens van RIJKEN (1979) die, m.b.v. glasparels, tevens aanwijzingen heeft gekregen dat de pier

voornamelijk uit de drijfzand kolom eet en weinig anaeroob zand verwerkt. Het voedsel en de wijze van voedselopname van de wadpier is nog onduidelijk.

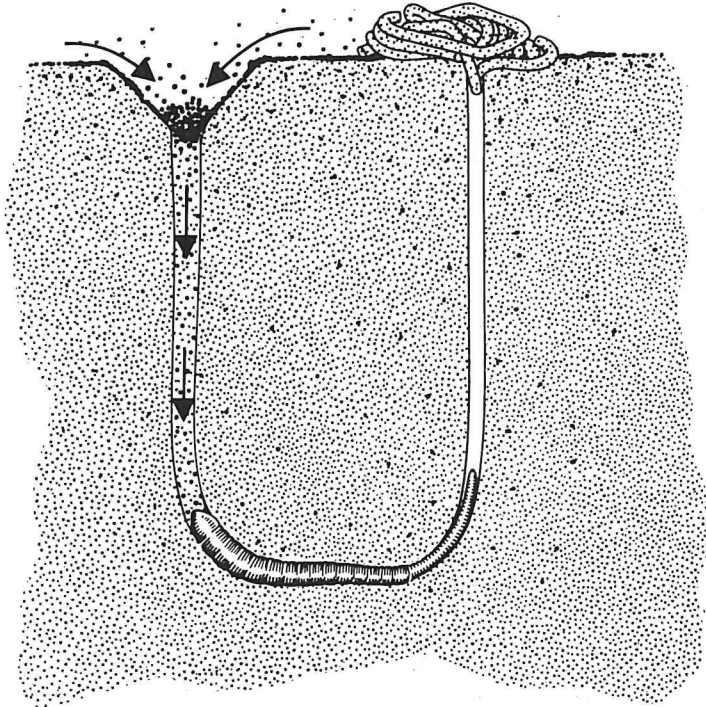


Fig. 1. Woonbuis van *Arenicola marina* waarin weergegeven de algemeen beschreven voedingswijze: een drijfzandkolom verbindt de trechter met de kop van de wadpier (naar RIJKEN 1979).

Er zijn aanwijzingen dat *Arenicola marina* detritus (GEORGE 1964), bacteriën (LIEFKENS e.a. 1979, RIJKEN 1979) en bentisch diatomeeën (RIJKEN 1979) eet. Meiofauna en planctonische organismen zijn nooit aangetoond in de ingewanden van de wadpier (KRÜGER 1971). Het voedsel wordt gegeten tesamen met het sediment waarbij een selectie plaatsvindt op korrelgrootte met een voorkeur voor de kleinere deeltjes (KRÜGER 1971, BAUMFALK 1979).

Voedseltoevoer kan op verschillende manieren mogelijk zijn:

- door aanvoer vanuit het ademhalingswater waarbij detritus en organismen voor de kop van de wadpier blijven steken door de filterwerking van het zand (KRÜGER 1971).
- via de trechter en de drijfzandkolom, waarbij de trechter werkt als een val voor organisch materiaal en de drijfzandkolom als transportmiddel fungeert van het organische stofrijke oppervlakte sediment naar de kop van *Arenicola marina* (De WILDE 1975, RIJKEN 1979).
- Volgens het "gardening concept" beschreven door HYLLEBERG in 1975. Volgens dit concept vindt verrijking aan biomassa plaats voor de mond van de wadpier door groei en vermenigvuldiging van micro-organismen in het sediment dankzij aanvoer van zuurstofrijk water en organische stof rijk materiaal aan de trechterzijde van de woonbuis.

Deze wijzen van voedseltoevoer verhogen de biomassa in het sediment van de woonbuis t.o.v. het wadsediment.

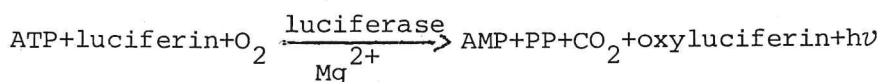
Een inzicht in de grootte van de biomassa in het sediment kan op snelle en redelijk betrouwbare wijze verkregen worden door de meting van adenosinetrifosfaat (ATP). Deze verbinding is de schakel van chemische energie in de cel en koppelt de anabolische en katabolische processen.

Door deze eigenschap is ATP in alle levende cellen aanwezig en wordt de verbinding, tevens door een snelle afbraak, in dode cellen niet teruggevonden. Voor de schatting van de biomassa wordt i.h.a. een omrekeningsfactor aangenomen van 250× de concentratie aan ATP. Deze omrekeningsfactor is bepaald vanuit onderzoek van 7 soorten mariene bacteriën algen (KARL 1980).

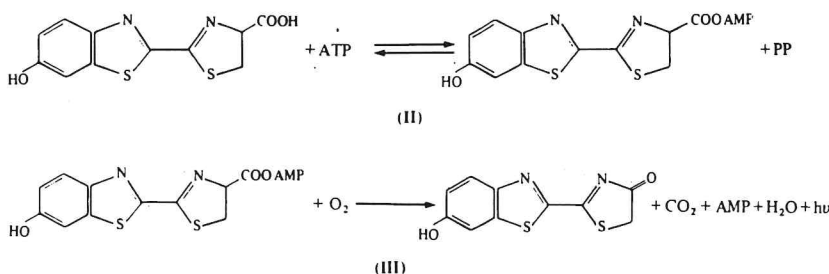
ATP-metingen ten behoeve van schattingen van de biomassa van micro-organismen wordt veel toegepast zowel in het water

(oceanen, estuaria, neritische zones en meren) als in het sediment. Een overzicht van auteurs en meetwaarden wordt gegeven door KARL (1980).

De meting van ATP berust op een enzymatische reactie waarbij ATP m.b.v. lucifering-luciferase, geïsoleerd uit de vuurvlieg *Photinus pyralis*, wordt afgebroken tot AMP waarbij o.a. een foton vrijkomt.



Het reactiemechanisme verloopt als volgt:



THORE (1979)

De lichtemissie van de vrijkomen fotonen is maximaal bij 562 nm en kan op diverse wijzen gemeten worden bijvoorbeeld m.b.v. een scintillatieteller (ERNST & GOERKE 1974), een spectrofluorimeter (PAMATMAT & SKJOLDAHL 1979) of een speciaal voor ATP metingen ontwikkelde Lumac biocounter.

Het review artikel van KARL (1980) levert een uitgebreid overzicht van methodieken die gebruikt worden voor extractie van ATP. Bij vergelijking van de diverse extractie methoden blijkt er een grote diversiteit in voorkeur te bestaan welke deels samenhangt met de samenstelling van het monster. Daar de meest voorkomende methodieken, nl. extractie met een kokende buffer of een koud zuur, vrij arbeidsintensief zijn is gezocht naar een snelle en makkelijk handelbare methode.

De resultaten van STREEFKERK (1979) en VAN STAVEREN (niet gepubliceerd) geven aanwijzingen dat de extractie methode van Lumac, m.b.v. NRB (nucleotide releasing reagens voor microbiële cellen), een even goede zoniet betere extractie van ATP geeft als de bovenstaand genoemde methodieken.

Hoewel ATP een aanwijzing geeft over de biomassa geeft het geen indicatie van de activiteit en/of groei van de organismen. Veel enzymatische reacties worden beïnvloed door de concentraties van adenosinefosfaten: ATP en/of ADP en/of AMP. Eiwitsynthese en groei blijken bij in vitro studies nauw gecorreleerd te zijn met de z.g. Energy Charge: de verhouding van energierijke adenosinefosfaten t.o.v. het totaal aan adenosinefosfaten.

In formule:

$$E.C. = \frac{ATP + \frac{1}{2}ADP}{ATP + ADP + AMP} \quad (ATKINS 1968)$$

In praktijk blijkt de E.C. tussen nauwe grensen te variëren. Bij een groeiend(e) organisme of populatie liggen de grensen $0,8 < E.C. \leq 1$, bij geen groei of in stress situaties is de $E.C. \approx 0,5$. De E.C. kan dan ook aanwijzingen geven of op een bepaalde plaats en/of diepte, b.v. vlak voor de mond van de wadpier, er een sterke groei van organismen plaatsvindt.

Berekeningen van de E.C. zijn uitgevoerd in het water door o.a. KARL & HOLM-HANSEN (1978) en in het sediment door o.a. ERNST (1970) en CONKLIN & Mac GREGOR (1972). De E.C.-berekening is echter soms moeilijk te interpreteren daar in mengpopulaties één deel van de populatie sterk kan groeien terwijl een ander deel niet hiertoe in staat is hetgeen resulteert in een vrij lage E.C.

Behalve door ATP en E.C. bepalingen is het ook mogelijk

om een indruk te krijgen van aanwezigheid en activiteit van (micro)organismen door de respiratie van het sediment - in het algemeen in O_2 -consumptie uitgedrukt - te meten. De chemische oxidatie is echter een sterk storende factor.

Tevens kan de potentiële activiteit van de ademhalingsketen (Electronen Transport Systeem: E.T.S.) worden bepaald. Dit heeft als voordeel dat van het totaal van zowel aerobe als anaerobe organismen de ademhalingscapaciteit op een snelle wijze gemeten kan worden onafhankelijk van de elektronen-acceptor (VOSJAN & OLAŃCZUK-NEYMAN 1977).

TAYLOR & OREMLAND (1979) hebben aangetoond dat het mogelijk is m.b.v. CrO_4^{2-} de ATP synthese van sulfaatreducerende bacteriën te blokkeren daar deze stof concurreert met SO_4^{2-} . In plaats van het verloop van de normale reactie: $SO_4^{2-} + ATP \rightarrow APS + P-P$ (VOSJAN 1970) wordt APCr gevormd, dit wordt in AMP omgezet er wordt geen nieuw ATP gevormd via het ETS systeem. Dit gegeven biedt mogelijkheden om de bijdrage van SO_4^{2-} reduceerders tijdens de ATP metingen te bepalen.

Het doel van dit 6-maands onderzoek was een inzicht te krijgen in aanwezigheid en activiteit van (micro)organismen in en rondom de woonbuis van *Arenicola marina*. Dit kan mogelijk meer kennis opleveren over de voedingswijze van de wadpier en de invloed die het dier heeft op de mineralisatie van organisch materiaal door bioturbatie van het sediment.

Hiertoe zijn zowel in het wad als in een experimentele opstelling ATP-, E.T.S.-, E.C.-, Chlorofyl a- en respiratie metingen uitgevoerd.

3. MATERIAAL EN METHODEN

3.1. MONSTERNAME

Met een microspatel werd een monster van het te onderzoeken sediment genomen. Hiervan werd na de meting het drooggewicht bepaald (24 uur drogen bij 100 °C). Voordelen van deze methode, boven het nemen van een bepaald volume van een monster, zijn:

- 1- een snellere monstername waardoor minder verstoringen door de monstername zullen optreden.
- 2- een grotere nauwkeurigheid in de bepaling van de hoeveelheid monster.

3.2. ONTWIKKELING VAN DE ATP-METING

Een methode tot bepaling van ATP wordt beschreven in de LUMAC gebruiksaanwijzingfolder.

Deze methode werd echter op een aantal punten gewijzigd:

- daar de monsters zeer klein zijn (0,01 - 0,14 g) werd 400 µl HEPES, NRB (1:1) toegevoegd.
- Na mengen van het sediment met HEPES, NRB (1:1) werd het monster gecentrifugeerd. Dit gaf een stabielere en hogere opbrengst aan RLU's (relative light units) dan bij bezinken van het sediment daar storing door zwevende bodemdeeltjes voorkomen wordt.
- In plaats van één interne standaard werden twee interne standaarden toegevoegd waarbij, d.m.v. de berekening van de regressielijn door de drie punten, de hoeveelheid ATP in het monster bepaald kan worden. Dit wordt gecorrigeerd voor het aantal RLU's van de reagensblanco: 200 µl NRB, HEPES (1:1) en voor het aantal RLU's van de sedimentblanco, welke bereid werd door sediment 10 min tot 100 °C te verhitten en daarna 200 µl NRB, HEPES (1:1) toe te voegen.

Correctie voor het aantal RLU's in de sedimentblanco

werd uitgevoerd daar o.a. GRAF & LAGALY (1980) aangetoond hebben dat adenosine-5-fosfaten geadsorbeerd kunnen worden aan kleimineralen. De waarde van de sedimentblanco was meestal niet sterk afwijkend van de reagensblanco.

Tevens werd gecontroleerd op welke wijze het beste de ATP-extractie uitgevoerd kan worden.

- De invloed van de inwerkingstijd van NRB, HEPES werd bepaald door na 2,5, 5, 10, 20 of 60 minuten incubatietijd het aantal RLU's te meten. Na 10 en 20 minuten incubatietijd werd een stabiel hoge opbrengst gevonden. Gekozen werd om bij de experimenten een incubatietijd van 10 minuten aan te houden.
- Ter bepaling van de optimale hoeveelheid monster in het lumacuvet werd vanuit het supernatant resp. 10, 20, 40, 60 en 100 µl in het lumacuvet gepipetteerd en aangevuld tot een eindvolume van 200 µl m.b.v. NRB, HEPES (1:1).

Alleen bij het 100 µl monster werd minder ATP teruggevonden (20%). Echter hoe meer monster toegevoegd hoe kleiner de helling gevormd door het monster en de twee interne standaarden. Dit suggereert dat het aantal RLU's relatief vermindert bij meer sediment.

Mogelijke oorzaken van deze remming zijn:

- (1) het nog voorkomen van zwevende deeltjes in het supernatant. (2) storing door anorganische ionen in het supernatant zoals b.v. chloride (GILLES e.a. 1976, Van STAVEREN Fig. 2).

Door deze remming is het niet mogelijk ATP te bepalen m.b.v. een ijklijk maar moet steeds gewerkt worden met een interne standaard.

Bij voorkeur werd 20 µl monster gepipetteerd in 180 µl NRB, HEPES (1:1).

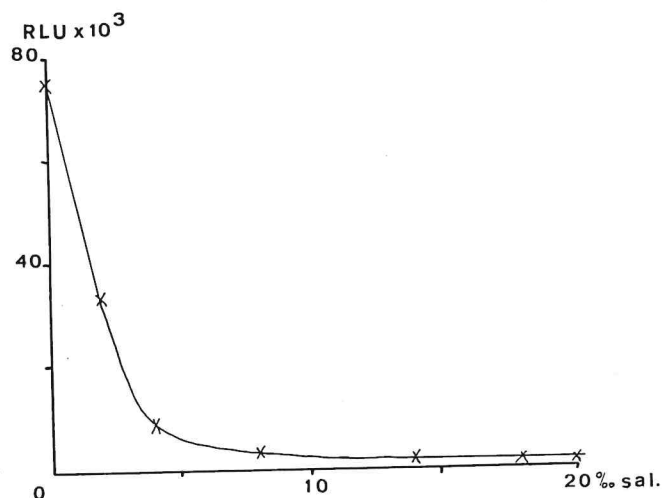


Fig. 2. Effect van saliniteit op de ATP-meting (naar van STAVEREN).

- De invloed van het tijdstip van toediening van de interne standaard werd gecontroleerd door vergelijk van de terugvondst van de interne standaard toegediend, of vlak voor het pipetteren van luciferine-luciferase of aan het begin van de bewerking dat is voor de incubatietijd van 10 minuten. Voor dit experiment werden de sedimentmonsters met behulp van stoom gesteriliseerd: 30 min 160 °C. Op deze wijze werd de spreiding veroorzaakt door de monsters zo gering mogelijk gemaakt. Er werden geen aanwijzingen gevonden dat er een invloed was van het tijdstip van toedienen van de interne standaard. Uit praktische overwegingen werd besloten de ATP-standaard vlak voor het toedienen van luciferine-luciferase te pipetteren.
- Het met de hand toedienen van interne standaarden na de meting van het monster, met behulp van luciferine-luciferase, lukte niet. Dit zou nl. het verbruik van deze dure stof met 2/3 verminderen. De verkregen resultaten waren, ondanks de met de stopwatch gestandaardiseerde werkwijze,

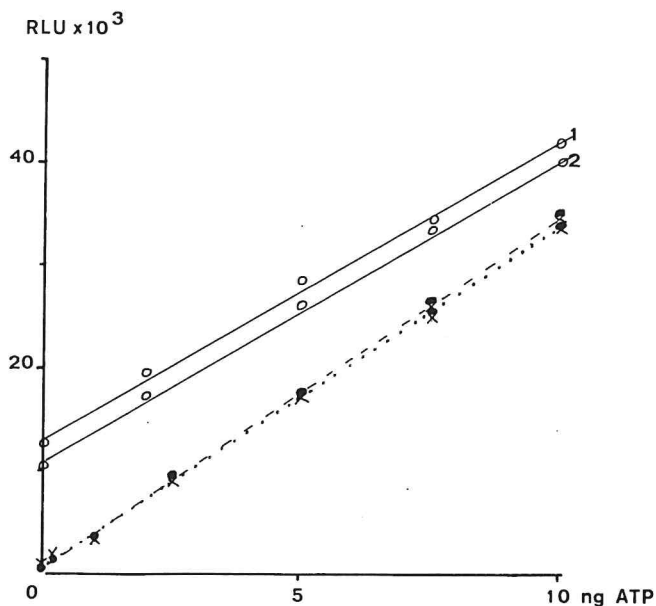


Fig. 3. Grafisch verband tussen RLU en diverse ATP concentraties toegevoegd als interne standaard bij diverse monsters: reagensblanco (●), sedimentblanco (x), sedimentmonsters (O) 1 en 2.

- niet reproduceerbaar. Tevens werd de toegevoegde interne standaard zeer slecht teruggevonden ten opzichte van de bepaling op de gebruikelijke wijze
- De invloed van de grootte van de interne standaarden werd nagegaan door 6 verschillende concentraties ATP aan sedimentmonsters toe te voegen (Fig. 3).
De correlatie tussen de punten is zeer hoog: $r = 0,999$. Het maakt echter verschil of de hoeveelheid ATP berekend wordt vanuit alle punten of alleen vanuit drie punten. Om dit te standaardiseren is besloten de interne standaarden zo te kiezen dat deze resp. ca. $2\frac{1}{2}$ en 5 maal het aantal RLU van het monster zouden bedragen.
- De invloed van het bewaren van sedimentmonsters is bepaald door vergelijking van verse monsters met monsters bewaard in de vriezer of in vloeibare stikstof. Twee maal werd een

geringe achteruitgang gevonden in de vloeibare stikstof na 5 dagen (ca. 7%) en na 10 dagen (ca. 20%), terwijl in de vriezer het ATP-gehalte na 5 dagen ca 80% achteruitgaan was. Echter één maal werd de grootste afname gemeten in de, in vloeibare stikstof, bewaarde monsters. De monsters waarvan het ATP-gehalte sterk verlaagd was bleken tijdens het bewaren geoxideerd te zijn: in plaats van de oorspronkelijke grijs-zwarte kleur was het sediment geel gekleurd. Uit praktische overwegingen werd de dag na monsternamen de meting verricht. Tot die tijd werden de monsters in de vloeibare stikstof bewaard.

3.3. ATP-METING

Met een microspateltje werden bodemonsters genomen waarvan de gewichten varieerden tussen 0,01 en 0,14 g. De monsters werden gecodeerd, in aluminiumfolie verpakt en bewaard in de vloeibare stikstof tot de volgende dag. In een voorgewogen cupje werd dan aan het monster 400 µl NRB, HEPES (1:1) toegevoegd. Na 1 min mengen op de vortex werd 10 min gewacht - om NRB in te laten werken - waarna 3 min in een MSE swing out centrifuge bij maximaal toerental (3000 g) gecentrifugeerd werd. In een lumacuvet werd aan 20 µl supernatant 180 µl NRB, HEPES (1:1) toegevoegd. Bij bijzonder ATP-rijke monsters was dit resp. 10 en 190 µl. Getracht werd, na toevoeging van 100 µl lumitreagens (luciferine-luciferase), het aantal gemeten RLU's - over 30 sec geïntegreerd - tussen 9.000 en 20.000 te houden in monsters zonder interne standaard.

Aan de hand van het aantal RLU's in het monster werd zoveel interne standaard toegevoegd dat in 10 µl het aantal RLU's resp. 2,5 en 5 maal verhoogd zouden worden.

De gevonden ATP-waarden gecorrigeerd voor de reagensblanco waarde en voor de sediment-reagensblanco waarde. De metingen werden verricht met de Lumac Biocounter 2000. Tevens werden de gebruikte chemicaliën NRB, HEPES (pH 7.75) en het lumitreagens geleverd door Lumac. De fout in de meting veroorzaakt door de hierboven beschreven chemische methodiek geeft bij $n=8$ een s.d. van $\pm 2,2\%$.

3.4. ETS-METING

De ETS-meting is uitgevoerd volgens de in 1977 door OLAŃCZUK en VOSJAN beschreven methode.

Daar gewerkt is met kleinere sedimentmonsters namelijk 0,04 - 0,17 g is de homogenisatie uitgevoerd in 5 ml in plaats van 30 ml homogenisatie-buffer. Tevens werden homogenisatiebuisjes gebruikt in plaats van flesjes.

3.5. CHLOROFYL A METING

Het chlorofylgehalte in het sediment werd fluorimetrisch bepaald. Het voordeel van deze methode ten opzichte van de bepaling met behulp van een spectofotometer is dat lagere concentraties aantoonbaar zijn. Een nadeel is echter dat de methode minder nauwkeurig is (HEGEMAN pers. meded.).

Aan een sedimentmonster (0,04 - 0,14 g) werd 20 ml 90% aceton toegevoegd. Na 3 min onder koeling ultrasoon trillen in een MSE ultrasoon desintegrator werden de monsters 10 minuten gecentrifugeerd in een Hettich Universal II op stand 80 (3000 g). Het supernatant werd onverdund gemeten in een Turner fluorimeter III waardoor het totaal aan chlorofyl 1 + phaeopigmenten bepaald werd. De hoeveelheid phaeopigment werd bepaald door na de meting 1 druppel 10% HCl toe te voegen. Het verschil in meetwaarde geeft de hoeveelheid chlorofyl a in het monster.

3.6. RESPIRATIEMETING M.B.V. DE GILSON RESPIROMETER

1 ml sediment werd geschud met 1 ml, over 0,2 μ gefiltreerd, zeewater met een snelheid van 167 slagen per minuut. De meting werd in het donker uitgevoerd bij 10 °C. Het centrale vaatje was gevuld met 100 μ l 0,1M KOH ter absorptie van CO₂. In de tijd werd het gasverbruik van de sedimentmonsters gemeten ten opzichte van een referentievat.

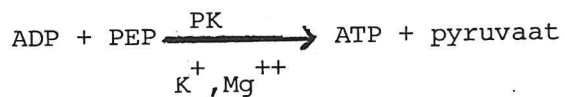
3.7. ENERGY CHARGE BEPALING

De E.C.-bepaling werd uitgevoerd met behulp van de Energy Charge kit van Lumac. De samenstelling van de chemicaliën wordt beschreven door deze firma.

De E.C. kan berekend worden door de bepaling van AMP, ADP, en ATP. Daar met behulp van het luciferine-luciferase systeem ATP gemeten wordt, werden ADP en AMP omgezet in deze verbinding. Ter bepaling van de E.C. werden dan ook 3 metingen uitgevoerd:

1) ATP

2) ATP + ADP waarbij ADP in ATP werd omgezet d.m.v. de volgende reactie:



3) ATP + ADP + AMP waarbij AMP + ATP $\xrightarrow[\text{Mg}^{++}]{\text{MK}}$ 2 ADP, hetgeen via

bovenstaande reactie werd omgezet in ATP.

In grote lijnen werd dezelfde werkwijze als van de ATP-bepaling aangehouden. Aan 20 μ l monstersupernatant werd 100 μ l reagens en 80 μ l NRB, HEPES (1:1) in een lumacuvet toegevoegd. Voor de aanbevolen incubatietijd van 30 minuten werd de interne standaard toegevoegd welke voor de ATP, ADP en AMP bepaling resp.

ATP, ADP en AMP was. In 10 μ l werd 2,5 of 10 ng interne standaard toegevoegd. De ADP en AMP-gehalten werden berekend door resp. de gevonden ATP en ADP + ATP waarden van de gemeten waarden af te trekken.

3.8. BEPALING VAN HET ATP-GEHALTE VAN SULFAATREDUCERENDE BACTERIËN

Het is mogelijk met behulp van $\text{CrO}_4^{=}$ de ATP-pool van sulfaat-reducerende bacteriën grotendeels uit te putten (TAYLOR & OREMLAND 1979). Ter bepaling van het aandeel van sulfaatreducerende bacteriën werden de ATP-monsters in twee groepen gesplitst: één deel werd gedurende 30 minuten onder N_2 bij 30 °C geïncubeerd met 400 μ l 10 mM K_2CrO_4 in HEPES, het andere deel werd op identieke wijze geïncubeerd met 400 μ l HEPES. Na de incubatietijd werden de volumina met HEPES aangevuld tot het oorspronkelijke volume.

Na toevoeging van 400 μ l NRB werd de normale ATP-meting uitgevoerd, er werd echter 40 μ l in plaats van 20 μ l monstersupernatant in het lumacuvet gepipetteerd.

Voor de invloed van K_2CrO_4 in de monsters werd gecorrigeerd door deze stof ook te verwerken in de monster- en sediment-blanco.

4. EXPERIMENTEN EN RESULTATEN

4.1. I. BESCHRIJVING VAN EEN PROFIEL VAN DE WADBODEM

4.2. METHODEN

Met behulp van een plastic monsterpijp werd een kern uit het sediment gestoken met een diameter van 6 cm en ca. 20 cm lengte. Hieruit werden op 2½, 5, 10, 15 en 20 cm diepte monsters genomen. Oppervlakte sediment werd apart verzameld. De kernen werden gestoken op 8-10, 23-11 en 18-12-'81. Op boven-

staande diepten werd in 2- of 3-voud het ATP-gehalte en de ETS-activiteit bepaald. Tevens werd bij het monster genomen op 8-10-'81 het chlorofyl 1 gehalte bepaald en werd de respiratie van het sediment gemeten op 8-10 en 23-11-'81. Bij de laatste bepaling werd getracht biologische en chemische oxidatie te scheiden door in de helft van de monsters 2 druppels cresol toe te voegen analoog aan de werkwijze van LUI & STRACHAN (1977, 1980).

4.3. RESULTATEN

De gemiddelden van ATP-gehalten van het sediment zijn per monsterdatum weergegeven in Fig. 4a. Het ATP-gehalte neemt in het algemeen met de diepte snel af: het oppervlaktesediment is het rijkst aan ATP en op 10 cm diepte is ca. 10% van deze concentratie terug te vinden. Evenredig met de ATP concentratie neemt de ETS-activiteit van het sediment in de diepte af Fig. 4b. De curven blijken nauw gecorreleerd te zijn: $r = 0,87$ bij $n = 19$ ($0,42 \text{ p} = 0,05$). Daar niet zeker is of de resultaten uit een normale verdeling komen (voorwaarde voor de regressie berekening) is ook met een verdelingsvrije toets getest: de rangcorrelatie toets. Ook nu wordt een significante correlatie gevonden: $S = 104$ bij $n = 19$ ($49 \text{ p} = 0,05$). De hoeveelheid ATP lijkt in de loop van de tijd, oktober tot januari, af te nemen (Fig. 4a). Er zijn echter te weinig metingen gedaan om een duidelijke uitspraak te kunnen doen.

De distributie van chlorofyl a in de vertical, gemeten in de kern van 8-10-'81, staat weergegeven in Fig. 5a. Omdanks het geringe aantal waarden ($n=6$) wordt er een significante correlatie gevonden met het ATP-gehalte: $s=12$ $r=0,74$ (resp. $s=11$; $r=0,73$ bij $p=0,05$).

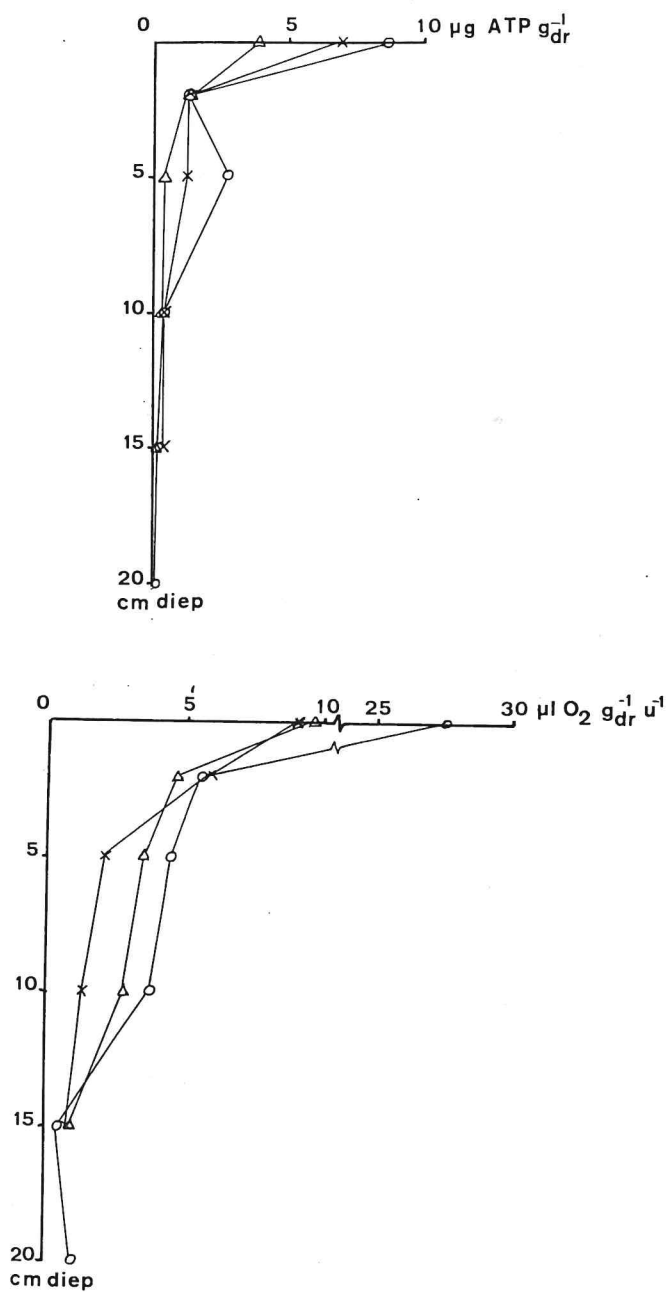
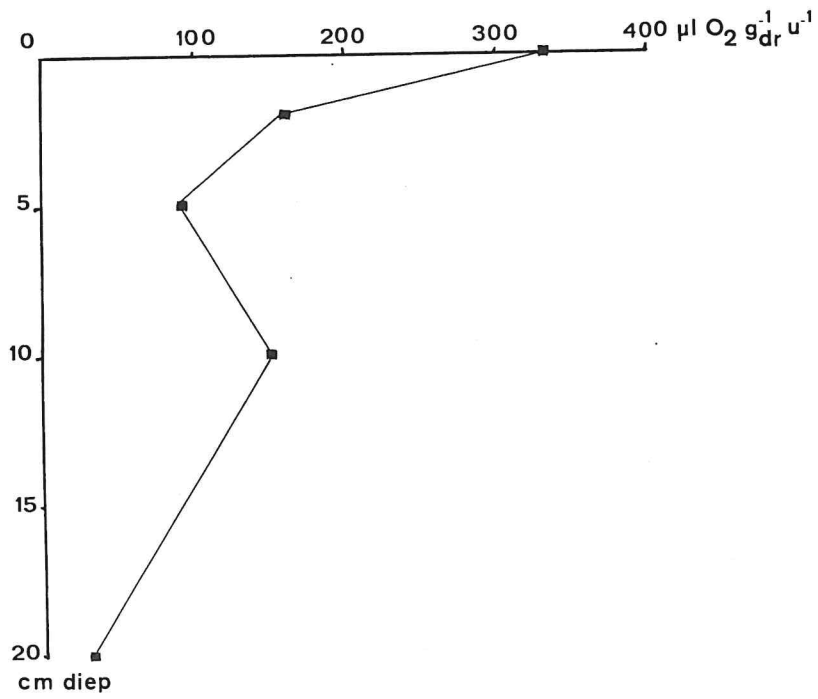
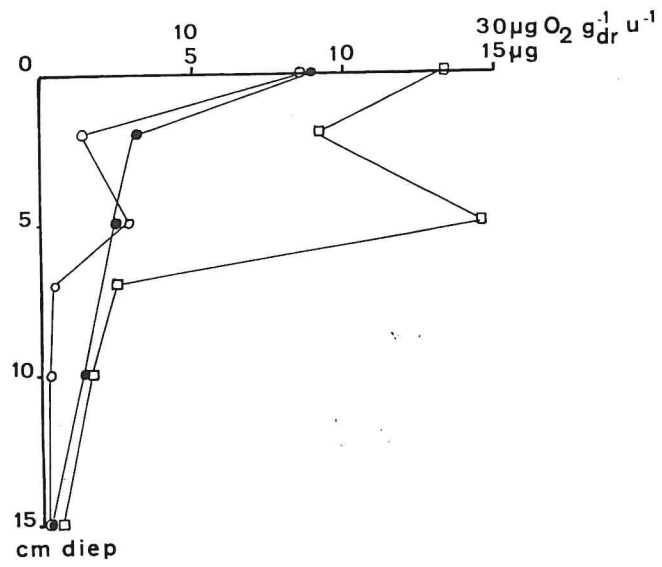


Fig. 4. Verticale verdeling van ATP in $\mu\text{g/g}$ droog sediment (4a) en ETS in $\mu\text{l O}_2/\text{g}$ droog sediment $\times$ uur (4b) in het sediment van de NIOZ-haven op 8-10-'81 (O), 23-11-'81 (x), en 18-12-'81 (Δ).



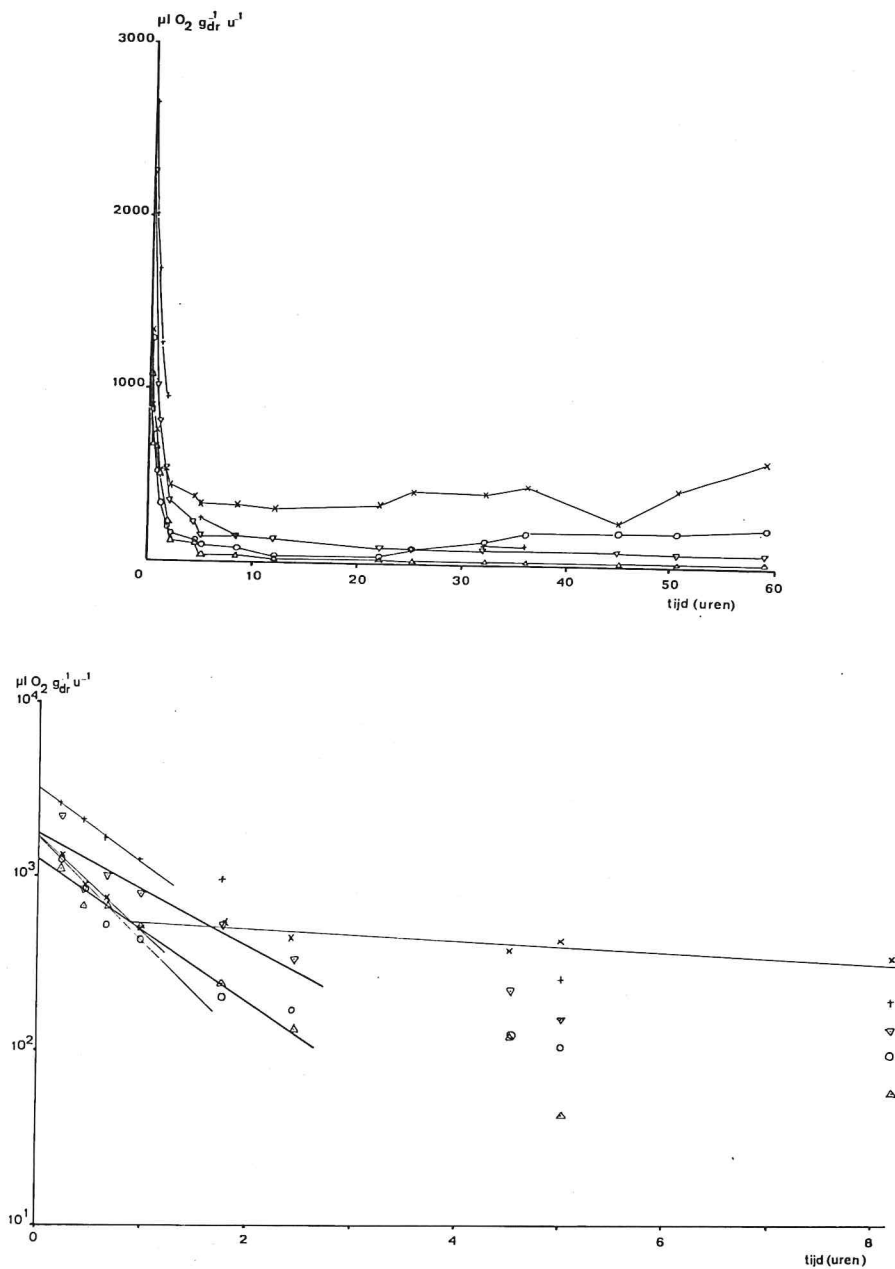


Fig. 5. Verticale verdelingen van: a. ATP (O) chlorofyl a ($\square$) in $\mu\text{g/g}$ droog sediment en ETS ($\bullet$) in $\mu\text{l O}_2/\text{g}$ droog sediment $\times$ uur. b. respiratie gemeten met de Gilson respirometer ($\blacksquare$) in $\mu\text{l O}_2/\text{g}$ droog sediment $\times$ uur. c. respiratie in $\mu\text{l O}_2$ consumptie/gr droog $\times$ uur op 0 ($\times$), 2 (+), 5 (O), 10 (∇) en 20 (Δ) cm diepte uitgezet tegen de tijdsduur van de meting. d. zie c. echter de respiratie is eenzijdig logaritmisch uitgezet tegen de tijdsduur. Uit de curven c en d is curve b afgeleid. De bepalingen zijn uitgevoerd op 8-10-'81.

Tevens werd in deze kern met behulp van de Gilson respirometer de ademhaling van het sediment bepaald. In de tijd gemeten neemt de respiratie van de monsters sterk af (Fig. 5c), na ca. 2 uur wordt de afname minder. Bij het eenzijdig logaritmisches uitzetten van deze gegevens lijkt de curve uit twee lijnen te bestaan (Fig. 5d). De steilste kan dan eventueel de weergave van de chemische oxidatie zijn bijvoorbeeld van gereduceerde zwavelverbindingen; de vlakke (na 2 uur) lijn zou dan de biologische ademhaling weergeven. Wordt door berekening van de lineaire regressie het snijpunt van deze laatste lijn met de Y-as bepaald, dan blijken de waarden van de ademhaling ca. 20 tot 30 maal hoger te liggen dan de respiratie gemeten met de ETS methode (Fig. 5b). Dit is zeer bevreemdend daar de ademhaling gemeten met de ETS methode maximaal gestimuleerd wordt door het in overmaat toedienen van substraat. Het ligt dan in de lijn der verwachting dat de respiratie gemeten met de ETS methode hoger zou liggen dan die gemeten met de respirometer. Beide respiratie curven uitgezet tegen de diepte geven eenzelfde beeld: de meeste respiratie in het oppervlaksediment en een afname in de diepte.

Op 23-11-'81 werd de respiratie van monsters met en zonder cresol vergeleken. Geen duidelijke verschillen werden gemeten, mogelijk omdat te weinig cresol werd toegevoegd. De respiratie van de monsters zonder cresol staat weergegeven in Fig. 6b. In Fig. 6a staan ATP-gehalte en ETS-activiteit van deze monsters weergegeven. Bij vergelijking van de twee respirometingen blijkt de zuurstofopnamesnelheid gemeten met behulp van Gilson respirometer ca. 10 maal hoger te liggen dan berekend met de ETS bepaling.

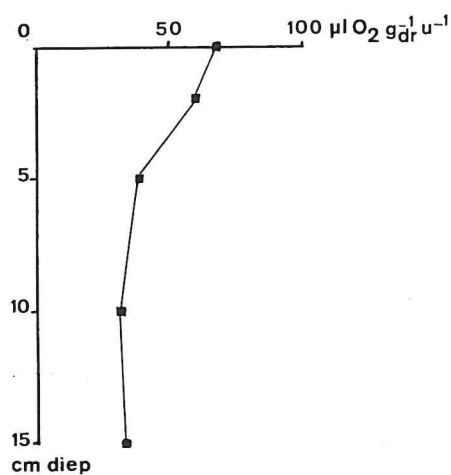
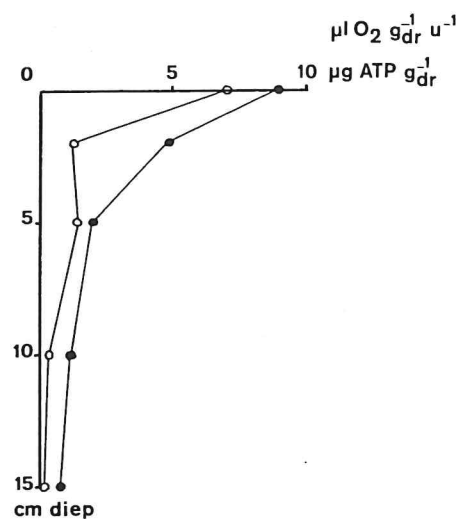


Fig. 6. Verticale verdelingen van: a. ATP (O) in $\mu\text{g/g}$ droog sediment en ETS-activiteit ($\bullet$) in $\mu\text{l O}_2$ consumptie/g. droog sediment $\times$ uur. b. respiratie ($\square$) in $\mu\text{l O}_2$ consumptie/g. droog sediment $\times$ uur, in het wad-sediment van de NIOZ-haven op 23-11-'81.

4.4. II. BESCHRIJVING VAN ENKELE BIOCHEMISCHE PARAMETERS

IN EN OM DE WOONBUIS VAN DE WADPIER

4.5. METHODEN

Om op een eenvoudige wijze woonbuizen van *Arenicola marina* te kunnen bemonsteren werden wadpieren in een experimentele opstelling in het aquariumgebouw gehouden. In een diepe asbestona bak werden cuvetten van $1,5 \times 22 \times 38$ cm (beschreven door de VLAS 1979) geplaatst. Deze werden gevuld met sediment uit de Mokbaai. Dit sediment werd laagsgewijs verzameld: namelijk oppervlaktemateriaal en sediment van resp. 2-5, 5-10, 10-15 en 35-35 cm diepte. In omgekeerde volgorde werden deze lagen in de cuvetten gestort. Dit werd onderwater gedaan opdat geen lucht ingesloten zou worden. Tevens was het zeewater doorborreld met N_2 bij het storten van de anaerobe lagen. Tijdens het storten werd het sediment gezeefd over een 1 mm zeef om schelpresten en grotere organismen te verwijderen. Na het bezinken van het sediment werd de asbestona bak voorzien van langzaam stromend zeewater, zodanig dat het wateroppervlak ca. 7 cm boven het sediment stond.

Na 2 weken werden in 30 cuvetten wadpier (één dier per cuvet) uitgezet. Zes cuvetten werden niet bezet door wadpieren: blanco's. Pieren die zich zeer traag ingroeven werden verwijderd. De pieren werden één maal per dag gevoerd met diatomeeënrijk oppervlakte sediment, dat in bevroren vorm werd bewaard. Door bevriezing en langere tijd ontdooien van dit sediment is het ATP en chlorofyl a gehalte zeer laag geworden waardoor de verstoring in de meting zeer gering is.

Elke dag werd de plaats van de poephoop genoteerd om een indicatie te krijgen of de wadpier zich verplaatst. Het demiddelde gewicht van de wadpieren was $2,84 \pm 0,56$ g.

Na twee weken werden de eerste cuvetten bemonsteerd. Het

water werd hiertoe langzaam afgevoerd om de trechter en de gang zoveel mogelijk in takt te houden. Het cuvet werd dan uit de bak gehaald en voorzichtig geopend.

Meestal lag het breukvlak van het sediment op de woonbuis welke dan voorzichtig verder werd uitgeprepareerd.

In en om negen woonbuis werd ATP gemeten. Bij drie bepalingen werden monsters uit een aantal buizen "gepoold" om voldoende materiaal te verkrijgen om zowel ATP, ETS als chlorofyl a te kunnen bepalen. Tevens werd een poging ondernomen de E.C. en de bijdrage aan ATP van sulfaatreducerende bacteriën te bepalen. Om te kunnen vergelijken of de ATP-gehalten in de cuvetten enigszins overeenkwam met de ATP-gehalten in het wad werden twee maal monsters genomen uit een woonbuis van een pier in het NIOZ-haven wad.

4.6. RESULTATEN

De gemiddelde waarden ($n=9$) van de ATP-bepalingen in de cuvetten in en om de woonbuis van de wadpier staan weergegeven in Fig. 7. De standaarddeviatie van de resultaten is vrij groot. Met behulp van de toets van Wilcoxon en met behulp van variantieanalyse is er getest of er wel of niet een verschil in ATP-gehalte van de woonbuis ten opzichte van het "wad" aanwezig is. Per diepteniveau zijn er in het algemeen geen significante verschillen in ATP-gehalten aantoonbaar tussen de woonbuis en het "wad", met uitzondering van 5 en 10 cm diepte aan de poephoozijde (beide toetsen) en op 7 cm diepte aan de trechterzijde (Wilcoxon) waar de woonbuis significant rijker aan ATP is dan het "wad". Dit is in grafiek 7 met een * aangegeven. Bij toetsen of de hele buis (trechter- of poephoozijde) significant in ATP-gehalte verschilde van het "wad" blijken de poephoozijde en de onderste 3 meetpunten van de

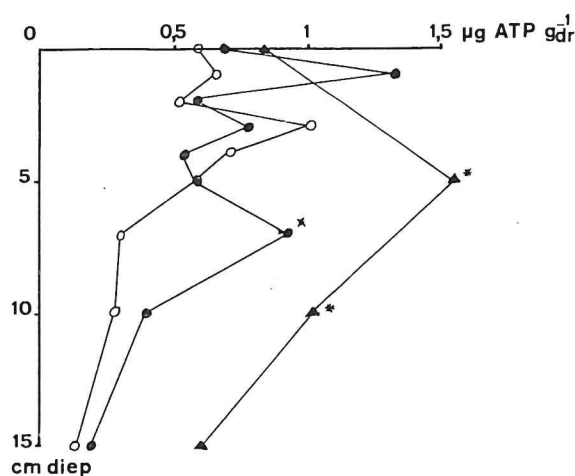
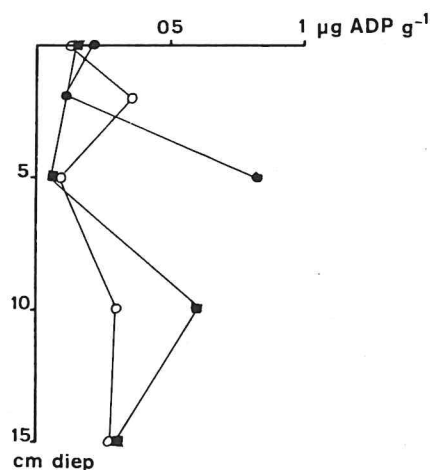
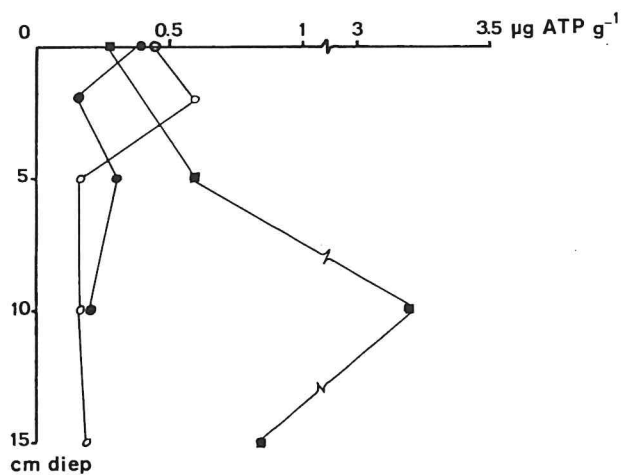


Fig. 7. Verticale verdeling van de gemiddelde ATP concentraties (n=9) in $\mu\text{g/g}$ droog sediment in "wad" (O), trechterzijde- (●) en poephoopzijde- (▲) woonbuis, gemeten in een experimentele opstelling. * = sign. meer ATP dan in het "wad" op die diepte.

trechterzijde (nl. 7, 10 en 15 cm) significant meer ATP te bevatten. Het clusteren van de gegevens was verantwoord daar de varianties homogeen waren.

Het ATP-gehalte in de cuvetten blijkt een 10 tot 20-voud lager te liggen dan de gehalten gemeten op het NIOZ-wad op 29-10 en 23-11-'81. De curven van het NIOZ-wad en van de cuvetten lijken dezelfde tendens te tonen. Er zijn echter te weinig gegevens om bij de monsters genomen op het NIOZ-wad te bepalen of het ATP-gehalte in de woonbuis afwijkt van van het gehalte op het wad. Dit wordt ook veroorzaakt door de geringe monsterdiepte hetgeen te wijten is aan het hoge waterniveau, waardoor diepere bemonstering onmogelijk is.

Ter illustratie van de drie metingen ter vergelijking van ATP- en chlorofyl a gehalte en ETS-activiteit (in de cuvetten) worden de resultaten van 18-12-'81 weergegeven (Fig. 8a, c, d). De resultaten van de drie metingen zijn niet gemiddeld daar de spreidingen zeer groot zijn. In het algemeen komen deze



resultaten overeen met die van de meting van 10-1-'82. De ATP-gehalten van metingen van 14-1-'82 liggen echter een 4-voud lager. Daar er geen aanwijzingen zijn dat de meting op zich mislukt is, kan dit verschijnsel te wijten zijn aan het niet toedienen van voedsel gedurende een periode die aan deze meting voorafging. In Fig. 8a, b worden ADP en ATP gehalten van de monsters weergegeven. Daar de meting van AMP onbetrouwbaar is - soms een zeer slechte terugvondst van de interne standaard - is de E.C. niet berekend. Het reactie verloop van de

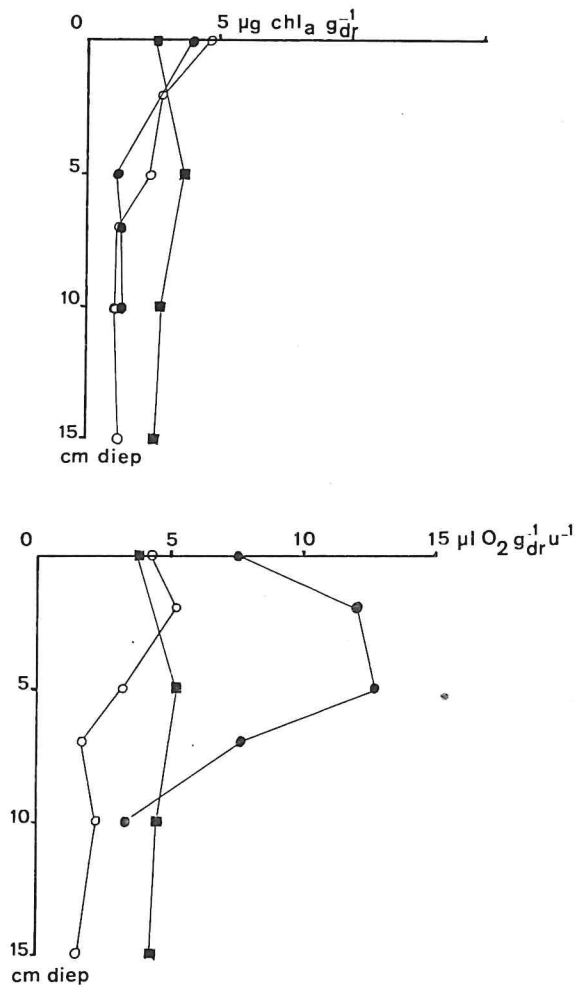


Fig. 8. Verticale verdeling van ATP (8a), ADP (8b), chlorofyl a (8d) in $\mu\text{g/g}$ droog sediment en ETS-activiteit (8c) in $\mu\text{l O}_2 \text{ consumptie/g droog sediment} \times \text{uur}$ in "wad" (O), trechterzijde- (●) en poephooptzijde- (■) woonbuis, gemeten in een experimentele opstelling (18-12-'81).

meting is weergegeven in Fig. 9. Mogelijk verloopt de vorming van AMP naar ADP slecht of worden de fotonen door het adeny-laatskinase, wat enigszins troebel is, verstrooid. In de woonbuis lijkt op grotere diepten wat verrijking van ADP en ATP ten opzichte van het 'wad' op te treden. Ook uit de resultaten van de meting van de maximale activiteit van het electronen

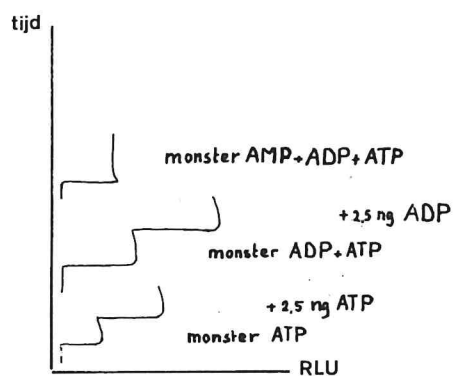


Fig. 9. Beeld van het verloop van een ATP, ADP + ATP en AMP + ADP + ATP meting, gevolgd met de schrijver ter bepaling van de E.C.

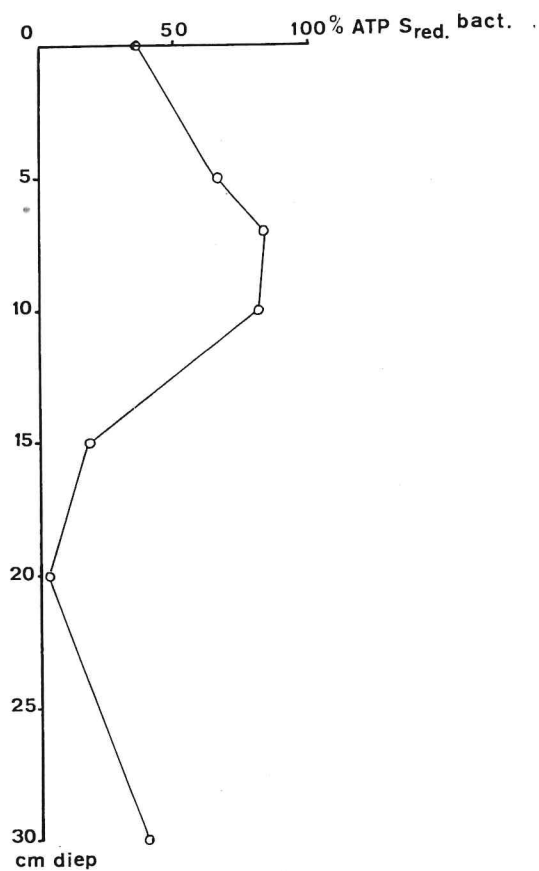


Fig. 10. Verticale verdeling van de ATP bijdrage van zwavel reducerende, bacteriën, bepaald door toevoeging van 10 nM CrO_4 , in % van het totaal gemeten ATP in het sediment op 20-1-'82

transport systeem blijkt dat de monsters uit de woonbuis in het algemeen het meest actief zijn (Fig. 8c). Met behulp van de rangcorrelatie toets is aantoonbaar dat de twee parameters, ATP en ETS, gecorreleerd zijn ($s = 275$ bij $n = 30$). De regressielijn $y = 1,85 + 0,074 \times$ heeft een regressiecoëfficiënt $r = 0,45$.

Het chlorofyl a gehalte is weergegeven in Fig. 8d. Dit blijkt zeer weinig in de diepte af te nemen wat op een enigszins onnatuurlijke situatie kan duiden.

5. DISCUSSIE

Overeenkomstig met de resultaten van PATMATMAT & SKJOLDAL (1979) blijkt de variatie in ATP-gehalten op eenzelfde diepte in één monster zeer groot te zijn (S.D. 6-36% bij $n=6$). Daar de variatie veroorzaakt door de chemische analyse zeer klein is (S.D. 2,2 bij $n=8$), is waarschijnlijk de heterogene verspreiding van de organismen in het sediment hieraan debet.

Het gehalte van ATP in het sediment van het NIOZ-haven wad (Fig. 4a) is, vergeleken met de gegevens van YINGST (1978), PATMATMAT & SKJOLDAL (1979), CHRISTIAN e.a. (1975) en KARL (1980), hoog. Dit kan wijzen op: (1) een sterk verbeterde ATP extractie, en /of (2) een sediment zeer rijk aan organische stof.

Daar de, in dit verslag, beschreven waarden hoger liggen dan de waarden gevonden door STREEFKERK (1979) is er een aanwijzing dat de eerstgenoemde oorzaak zeker een rol zal spelen. Dit is te verklaren door het gebruik van een nieuw lumit enzym-preparaat welk stabiel is en minder door nevenreacties wordt gestoord (THORE 1979).

De distributie van ATP en chlorofyl a vertoont in het algemeen evenals de ETS-activiteit en de respiratie een afname in de verticaal van het sediment (Fig. 5a). Tevens nemen de

hoeveelheid ATP en de ETS-activiteit af in de loop van de onderzoeksperiode (oktober tot januari). Overeenkomstige profielen zijn beschreven door YINGST (1978), PATMATMAT & SKJOLDAL (1979), CHRISTIAN e.a. (1975) voor ATP en door VOSJAN & OLANCZUK (1977) voor de ETS-activiteit. Ter bepaling van het koolstofgehalte van de levende stof is op grond van onderzoek met 7 soorten mariene bacteriën en 30 soorten marine algen een C/ATP ratio vastgesteld op 250 door HOLM-HANSEN & BOOTH (1966). ERNST & GOERKE (1974) vonden bij bestuderen van nematoden een lagere ratio namelijk 85 - 175. GERLACH (1978) stelt dan ook voor bij niet gezeefde monsters een ratio van 200 aan te houden. In het oppervlaktensediment van het NIOZ-haven wad is het koolstofgehalte van de biomassa, met gebruik van laatst genoemde factor, op 8-10, 23-11 en 18-12-'81 gemiddeld resp. 1,72, 1,34 en 0,98 mg/g. De bijdrage van algen aan dit koolstofgehalte is 10% (gebruikt is een C/chl.a ratio van 20, CADÉE & HEGEMAN 1977). Deze bijdrage is veel lager dan de door CADÉE & HEGEMAN (1977) gevonden waarden. Dit wordt veroorzaakt door de lage ATP-gehalten gemeten door CADÉE ten opzichte van de op 8-10-'81 gemeten waarden.

Door de ondergrondse levenswijze van *Arenicola marina* wordt het sediment in de diepere lagen verrijkt aan biomassa (Fig. 7 en 8a). Het "wad"-profiel van ATP, ETS en chlorofyl a in de cuvetten is niet zo fraai als de profielen gemeten in het NIOZ-haven wad. Dit wordt eventueel veroorzaakt door de wijze van storten van de cuvetten waar, door het verschil in bezinkingssnelheid van de verschillende sediment partikels een bandenpatroon gevormd is.

In de algemeen gangbare beschrijving van de woonbuis werd aan de trechterzijde vaak geen drijfzandkolom waargenomen, echter wel een echte buis met een doorsnede van ca. 5 mm met

geoxideerde wanden. De geringe turbulentie van het water, veroorzaakt door de afwezigheid van een getijde ritme, kan hier de oorzaak van zijn.

De verrijking van biomassa in de woonbuis kan veroorzaakt zijn door de combinatie van zuurstoftoevoer in een oorspronkelijk anaeroob en in het algemeen organische stof rijk sediment, gevolgd door een eventueel snelle groei en vermenigvuldiging van bacteriën in dit gebied (HYLLEBERG 1975) en de dientengevolge grote aantrekkingskracht van dit sediment voor meiofauna (GERLACH 1978, ALLER & YINGST 1978 en REISE 1981). De trechters waarbij de drijfzandkolom snel gegeten wordt kunnen vraagtekens geplaatst worden bij de realiteit van verrijking van de biomassa op deze wijze (RIJKEN 1979). Daar de biomassa van het sediment in de woonbuis in het algemeen niet groter is dan dat van het oppervlaktesediment, kunnen de resultaten ook verklaard worden door het naar beneden schuiven van een drifzandkolom.

Door JACOBSEN (1967) is gesuggereerd dat de filterwerking door het sediment van de micro-organismen uit het ademhalingswater nooit voldoende energie kan leveren voor het metabolisme van de wadpier. Geen enkele theorie kan worden uitgesloten, ook is het mogelijk dat de voedselvoorziening van *Arenicola marina* gestoeld is op een combinatie van de drie bovenbeschreven wijzen van voedsel verzamelen. Tevens moet gerealiseerd worden dat de wadpier ook regelmatig (max. 20%) anaeroob zand eet (RIJKEN 1979, LIEFKENS e.a. 1979).

Van STAVEREN (Fig. 11 en 12) vindt een veel sterkere toename van biomassa aan de trechterzijde van de woonbuis ten opzichte van de in dit verslag vermelde resultaten. Dit kan veroorzaakt worden door het verschil in jaargetijde waarin de metingen verricht zijn namelijk de zomer in plaats van herfst en winter. In de zomer zal de groei en reproductie van micro-

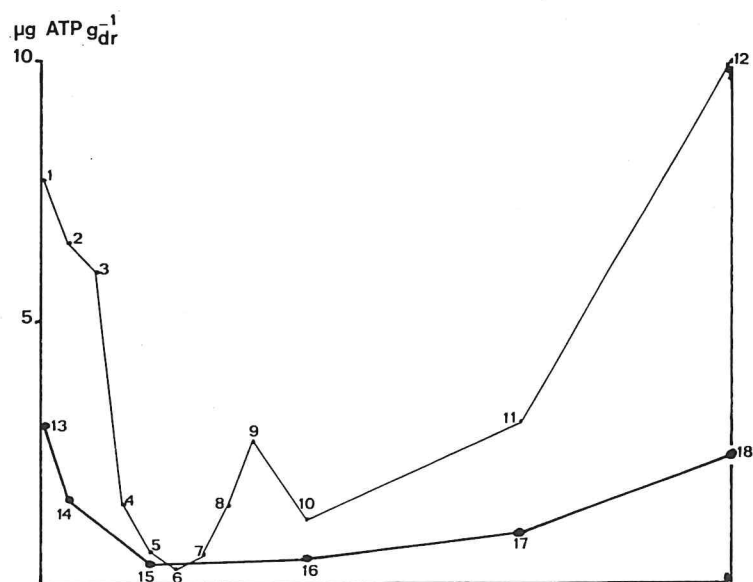
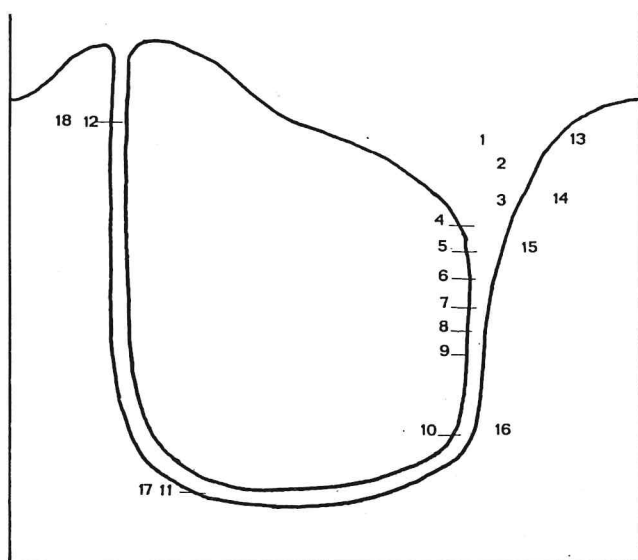


Fig. 11. ATP- gehalten in $\mu\text{g/g}$ droog sediment in en om de woonbuis van de wadpier.

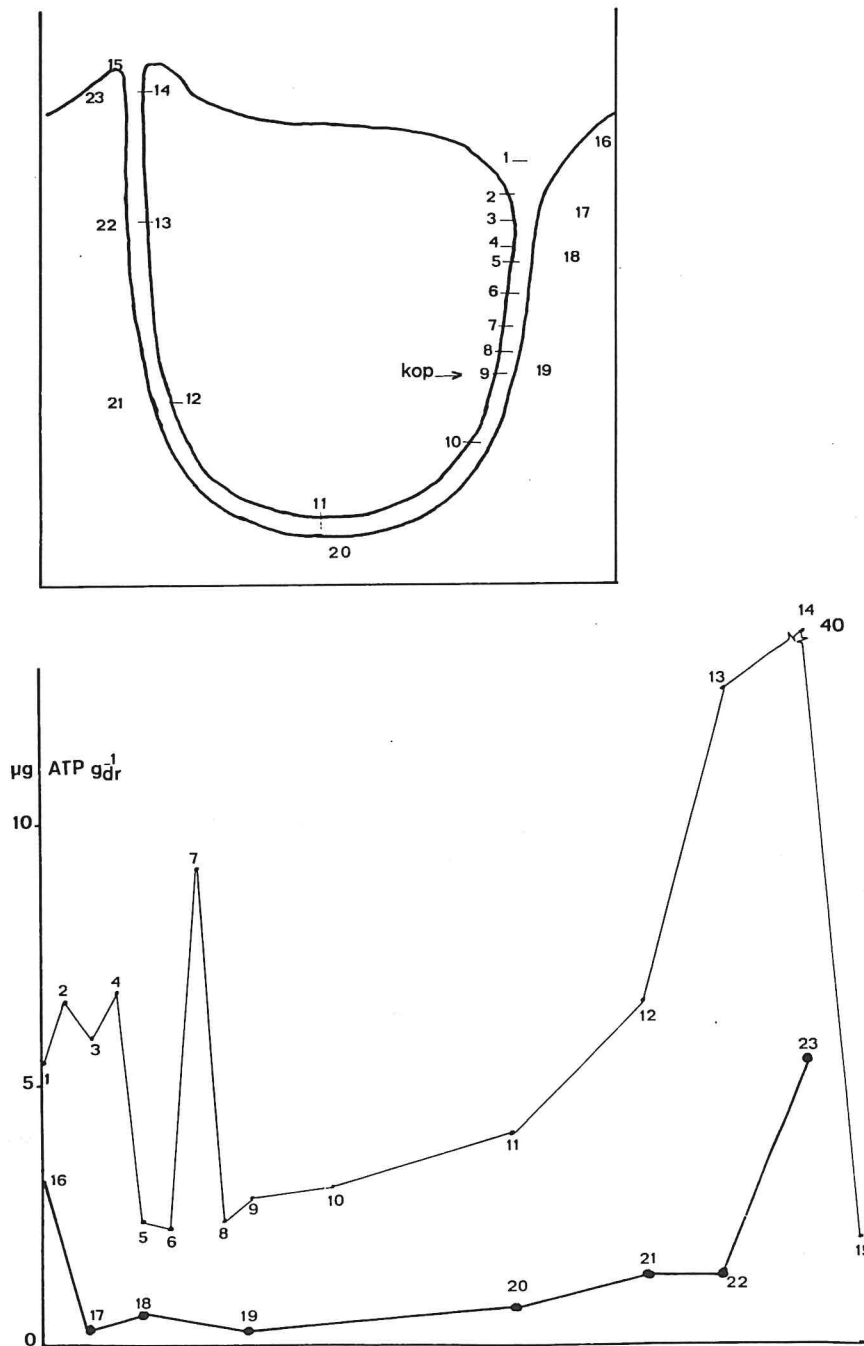


Fig. 12. ATP- gehalten in µg/gr droog sediment in en om de woonbuis van de wadpier (naar van STAVEREN).

organismen sneller zijn, tevens is de activiteit (b.v. pomp-snelheid) van de wadpier groter (BAUMFALK 1979a).

De toename van de biomassa aan de poephoozijde van de woonbuis is eventueel te verklaren door:

- de voorkeur van de wadpier kleine partikels te selecteren voor consumptie, welke door een groter oppervlak per gewichtseenheid beter ge(re)koloniseerd kunnen worden door micro-organismen.
- de aanwezigheid van een mucuslaagje aan de binnenzijde van de woonbuis aan de poephoozijde. Het is mogelijk dat hieraan organische stoffen geplakt blijven zitten die gekoloniseerd worden door micro-organismen.
- de aanwezigheid van zuurstof- en voedselrijk ex-anaeroob sediment, wat de ontwikkeling van micro-organismen bevordert.

Een toename van micro-organismen lokt tevens meiofauna aan (REISE 1981, GERLACH 1978, ALLER & YINGST 1978).

De Energy Charge is een maat welke de activiteit van de organismen in het sediment kan weergeven. Bepalingen van de E.C. kunnen eventueel inzicht verschaffen of de toename van de biomassa in de woonbuis aan de trechterzijde via een passief mechanisme verloopt (het naar beneden zakken van oppervlakesediment middels de drijfzandkolom) of via een actief process (hoge activiteit en delingssnelheid micro-organismen door een gunstig milieu in het sediment: gardening).

6. BIJLAGE, OF HAKEN EN VOETANGELS

Een groot probleem bij de experimenten is dat de resultaten moeilijk te correleren zijn daar voor elke bepaling een ander stukje sediment genoemd moet worden. Daar de natuurlijke distributie van organismen in het sediment zeer heterogeen blijkt te zijn, kan alleen door het uitvoeren van zeer veel bepalingen

een idee gevormd worden over de biomassa en de biomassaverandering veroorzaakt door bioturbatie. Dit verschijnsel geeft ook problemen bij vergelijk ATP-gehalte van het totaal aan (micro-)organismen en sulfaatreducerende bacteriën, alsmede bij de uitgevoerde respiratiemetingen waar een poging werd gedaan een onderscheid te maken tussen biologische en chemische oxidatie.

Met behulp van de gemeten parameters is getracht enig inzicht te krijgen in de biomassa en de activiteit van die biomassa in en rondom de woonbuis van de wadpier. De informatie die de parameters geven is echter niet altijd even betrouwbaar of makkelijk te interpreteren.

- ATP is een vrij goede parameter voor de biomassa. De verbinding is niet aanwezig in detritus en is dan ook een indicator voor de hoeveelheid levende organismen. Er zijn echter kleine hoeveelheden ATP die vrij opgelost in zeewater voorkomen (KARL 1980) hetgeen tot een overschatting van de biomassa kan leiden. Anderzijds kan ATP geadsorbeerd worden aan kleimineralen (GRAF & LAGERLY 1980) en/of fulvozuren (VAN WIJNGAARDEN 1977). Tevens is ATP niet een stof die onder alle omstandigheden in dezelfde hoeveelheid in de cel voorkomt, namelijk bij veroudering en onder stresssituaties daalt de hoeveelheid ATP in de cel.
- De Energy Charge als maat voor groei en reproductie is in een mengpopulatie vaak moeilijk te interpreteren daar niet alle individuen en soorten even actief op eenzelfde tijdstip zullen zijn zodat een vrij lage Energy Charge nog geen indicatie hoeft te zijn dat er geen groei plaatsvindt. Tevens kan stress veroorzaakt door monsternamen en monsterbewerking de E.C. verlagen.
- De ETS bepaling is enigszins bruikbaar als indicator voor de

biomassa (zie correlatie ATP en ETS). Door de weergave van de potentiële activiteit van het elektronen transport systeem blijft echter de werkelijke activiteit van dit systeem onbekend. Eveneens wordt de activiteit van fermenterende organismen niet bepaald terwijl deze wel een belangrijke rol kunnen spelen bij de mineralisatie van organische stof.

Het is mogelijk de potentiële ETS-activiteit, evenals de respiratie, in een bepaalde eenheid uit te drukken daar niet duidelijk is welke verbindingen de elektronenacceptoren zijn.

- Bij de respiratie meting worden twee processen gemeten; de biologische en de chemische oxydatie. Het is nog niet gelukt deze te scheiden.

7. SUGGESTIES VOOR VERDER ONDERZOEK

RESPIRATIE METING

Meting met toevoeging van meer cresol bij de vaatjes waarin de chemische oxidatie gemeten wordt.

Metingen ter bepaling van het aandeel van sulfaatreducerende bacteriën:

- Incubatie van 30 min in een groter volume HEPES, met of zonder $\text{CrO}_4^{=}$, waarna het monster vlak voor de meting minder doorverdund wordt. Dit geeft een minder grote fout in de meting.
- Incubaties uitvoeren zowel onder stikstof als onder lucht aangezien bij de incubatie onder N_2 eventueel de aerobe bacteriën gedood worden. Dit verklaard dan de hoge waarde aan "sulfaatreducerders" in het oppervlaktensediment.
- De temperatuur van 30 °C is zeer belangrijk, waarschijnlijk in verband met de optimumtemperatuur.

METING VAN DE ENERGY CHARGE

- AMP meting ontwikkelen.
- Eventueel de incubatietemperatuur verhogen tot 30 °C.

8. LITERATUURLIJST

- ALLER, R.C. & J.Y. YINGST, 1978. Biochemistry of tube-dwellings: a study of the sedentary polychaete *Amphitrite ornata* (Leidy).—J. Mar. Res. 36 (2): 201-253.
- ATKINSON, D.E., 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feed-back modifiers.—Biochemistry. 7: 4030-4034.
- BAUMFALK, Y.A., 1979a. On the pumping activity of *Arenicola marina*.—Neth. J. Sea Res. 13 (3/4): 422-427.
- , 1979b. Heterogeneous flat sediment caused by bioturbation activity of *Arenicola marina* (polychaeta).—Neth. J. Sea Res. 13: 428-440.
- BEUKEMA, J.J., 1976. Biomass and species richness of the macrobenthic animals living on the tidal flats of the Dutch Wadden Sea.—Neth. J. Sea Res. 10 (2): 236-261.
- BEUKEMA, J.J. & J. de VLAS, 1979. Population parameters of the lugworm, *Arenicola marina*, living on tidal flats in the Dutch Wadden Sea.—Neth. J. Sea Res. 13 (3/4): 331-353.
- CADÉE, G.C., 1976. Sediment reworking by *Arenicola marina* on tidal flats in the Dutch Wadden Sea.—Neth. J. Sea Res. vol. 10(4): 440-460.
- CADÉE, G.C. & J. HEGEMAN, 1977. Distribution of primary production of the benthic microflora and accumulation of organic matter on a tidal flat area, Balgzand, Dutch Wadden Sea.—Neth. J. Sea Res. 11(1): 24-41.
- CHRISTIAN, R.R., K. BANKROFT & W.J. WIEBE, 1975. Distribution of microbial adenosine triphosphate in salt marsh sediments at Sapalo Island, Georgia.—Soil Science. 119 (1): 89-97.
- CONKLIN, A.R. & A.N. Mac GREGOR, 1972. Soil adenosine triphosphate: extraction, recovery and half life.—Bull. Environm. Contam. Tox. 7: 296-300.
- ERNST, W. & H. Goerke, 1974. ATP in Sedimenten und Nematoden in der nordostatlantischen Tiefsee.—Meteor. 18: 35-42.
- ERNST, W. 1970. ATP als indicator für die Biomasse marine Sedimente.—Oecologia 5: 56-59.
- GEORGE, J.D., 1964. Organic matter available to the polychaete *Cirri-formia tentaculata* (Montagu) living in an intertidal mud flat.—Limnol. Oceanogr. 9(3): 453-455.
- GERLACH, S.A., 1978. Food-chain relationships in subtidal silty sand marine sediments and the role of meiofauna in stimulating bacterial productivity.—Oecologia 33: 55-69.
- GILLES, R., A. PEQUET, J.J. Saire, A.C. SPRONCK & G. THOME-LENTZ, 1976. Effects of various ions on ATP determinations using the luciferine-luciferase system.—Arch. Intern. Physiol. Biochem. 84: 807-817.
- GRAF, G. & G. LAGALY, 1980. Interactions of clay minerals with adenosine-5-phosphates.—Clays Clay Miner. 28 (1): 12-18.

- HOLM-HANSEN, O. & C.R. BOOTH, 1966. The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance.—Limn. Oceanogr. 11: 510-519.
- HYLLEBERG, J., 1975. Selective feeding by *Abarenicola pacifica* with notes on *Abarenicola vagabunda* and a concept of gardening in lugworms.—Ophelia 14: 113-137.
- JACOBSEN, V.H., 1967. The feeding of the lugworm *Arenicola marina* L. Quantative studies.—Ophelia 4: 91-109.
- KARL, D.M. & O. HOLM-HANSEN, 1978. Methodology and measurement of adenylate energy charge ratio's in environmental samples.—Mar. Biol. 48: 185-197.
- KARL, D.M., 1980. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology.—Microbiol. Rev. 44 (49): 739-796.
- KRÜGER, F., 1971. Bau und leben des Wattwurmes *Arenicola marina*.—Helgoländer Wiss. Meeresunters. 22: 149-200.
- LIEFKENS, W., J.J. BOON & J.W. de LEEUW, 1979. On the occurrence of alkyl- and alk-1-enyldiacylglycerides in the lugworm *Arenicola marina*.—Neth. J. Sea Res. 13 (3/4): 479-486.
- LIU, D. & J.W.M. STRACHAN, 1977. Measurements of microbial oxygen consumption in lake sediment.—Canadian Research 30-31.
- , 1980. A field method for determining the chemical and biological activity of sediments.—Water Research 15: 353-359.
- OLANČZUK-NEYMAN, K.M. & J.H. VOSJAN, 1977. Measuring respiratory electron-transport-system activity in marine sediment.—Neth. J. Sea Res. 11: 1-13.
- PATMATMAT, M.M. & H.R. SKJOLDAL, 1979. Dehydrogenase activity and ATP concentration of marine sediments in Lindapollene, Norway.—Sarsia 56: 1-12.
- REISE, K. 1981. Gnathostomulida abundant alongside polychaete burrows.—Mar. Ecol. Progr. Ser. 6: 329-331.
- RIJKEN, M., 1979. Food and fooduptake in *Arenicola marina*.—Neth. J. Sea Res. 13 (3/4): 406-421.
- STRAATEN, L.M.J.U. van, 1952. Biogenetic textures and formation of shellbeds in the Dutch Wadden Sea.—Proc. K. Ned. Akad. Wet. B55 (5): 500-516.
- STREEFKERK, M., 1979. De vertical verdeling van ATP in het sediment vergeleken met de ETS activiteit en de berekening van de energy charge.—Int. Versl. 1979-14, NIOZ-Texel.
- TAYLOR, B.F. & R.S. OREMLAND, 1979. Depletion of adenosine triphosphate in *Desulfovibrio* by anoxanions of group IV elements.—Current microbiol. 3: 101-103.
- THORE, A., 1979. Technical aspects of the bioluminescent firefly luciferase assay of ATP. Scie. Tools 26: 30-34.
- TRUEMAN, E.R. & A.D. ANSELL, 1969. The mechanisms of burrowing into soft substrata by marine animals. Oceanogr. mar. Biol. Ann. Rev. 7: 315-366.
- VLAS, J. de, 1979. Secondary production by tail regeneration in a tidal flat population of lugworms (*Arenicola marina*), cropped by flatfish.—Neth. J. Sea Res. 13 (3/4): 362-393.
- VOSJAN, H.J., 1970. ATP generation by electron transport in *Desulfovibrio desulfuricans*.—Antonie van Leeuwenhoek 36: 585-587.
- VOSJAN, J.H. & K.M. OLANČZUK-NEYMAN, 1977. Vertical distribution of mineralization processes in a tidal sediment.—Neth. J. Sea Res. 11: 14-23.

- WELLS, G.P., 1945. The mode of life of *Arenicola marina*.—J. Mar. biol. Ass. U.K. 26: 170-207.
- WILDE, P.A.W.J. de, 1975. The rol van bodemdiatomeeën en detritus voor benthische evertibraten in de Waddenzee.—Symp. Wadden onderzoek Meded. Werkgroep Waddenonderzoek 1: 39-49
- WIJNGAARDEN, G. van, 1977. Experimenten over de invloed van sediment op het verlies van ATP bij de Tris extractie methode.—BOEDE intern verslag no. 2.
- YINGST, J.Y., 1979. Patterns of micro- and meiofaunal abundance in marine sediments, measured with the adenosine triphosphate assay.—Mar. Biol. 47: 41-54.

