

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

DE VERTIKALE VERDELING VAN ATP IN HET SEDIMENT,
VERGELEKEN MET DE ETS AKTIVITEIT EN DE
BEREKENING VAN DE ENERGY CHARGE*

door

MICKY STREEFKERK

INHOUD

I.	Summary en Samenvatting	2
II.	Inleiding	3
III.	Materiaal & Methoden	6
	a. Monstername	6
	b. Drooggewicht bepaling van het sediment	7
	c. ATP-extractie	7
	1. Lumacmethode	7
	2. Ernstmethode	8
	d. ATP meting	9
	1. Met de Lumac celltester	9
	2. Met de scintillatieteller	9
	e. Berekening van de ATP concentratie bijgebruik making van een interne standaard	10
	f. Bepaling ADP en AMP en berekening van de Energy Charge	10
IV.	Experimenten & Resultaten	12
	a. IJklijnen	12
	b. Scheiding van bacteriën en algen door middel van NRS en NRB	12
	c. Behandeling van het sedimentmonster	14
	1. Oplosmiddel	14
	2. Adsorptie aan het sediment	15
	3. Invriezen van het sedimentmonster	17
	4. Verdunnings faktor van het monster	19
	d. Interne standaard	19

* Intern verslag over werk verricht als doctoraal studie in de microbiologie voor de Vrije Universiteit te Amsterdam bij Prof. Dr. A.H. Stouthamer in het tijdvak mei tot november 1978 aan het NIOZ te Texel, onder leiding van Dr. J.H. Vosjan en E. Paupit.

e.	Vergelijking van de ATP concentratie van verschillende methodes op verschillende apparatuur .	20
f.	ATP en ETS bepalingen in het sediment	21
g.	Bepaling ATP, ADP, AMP en berekening van de Energy Charge	24
V.	Diskussie	26
VI.	Literatuur	33

I. SUMMARY

A method for measuring ATP, ADP and AMP levels in marine sediments with a nucleotide releasing reagents was developed and compared with the Ernst Tris-extraction method. The ATP concentration on the surface sediment as well in a natural tidal flat system (NIOZ-wad) as in an artificial tidal flat system (Wadbak-zuid) was measured and ranged from 257 to 1520 ng ATP g dry sediment⁻¹. ATP concentrations measured with the depth were compared with ETS activities. The correlation coefficient was 0.9. Furthermore were ATP, ADP and AMP concentrations measured and the calculated Energy Charge were 0.52 and 0.85.

SAMENVATTING

Een methode om ATP, ADP en AMP in marien sediment te meten met behulp van een nucleotide releasing reagents is ontwikkeld en vergeleken met de Tris-extractie van Ernst (1970). ATP concentraties van het oppervlakte sediment zowel op het NIOZ-wad als wadbak-zuid werden bepaald en varieerden van 257 - 1520 ng ATP g dr sediment⁻¹.

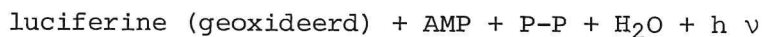
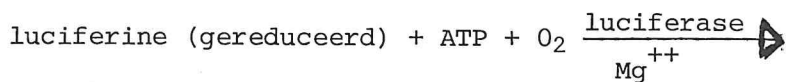
De in de diepte gemeten ATP concentraties werden vergeleken met ETS activiteiten. De correlatie coëfficiënt tussen ETS en ATP was 0.9. Verder werden ATP, ADP en AMP concentraties bepaald en daarmee de Energy Charge berekend die 0,52 en 0.85 bedroeg.

II. INLEIDING

Het is voor veel oecologische studies noodzakelijk om de biomassa en de mate van metabolische aktiviteit van verschillende typen organismen te kennen.

De meest conventionele technieken om microbiele biomassa te meten zoals bakterietellingen door kweken of microscopisch tellen zijn onbetrouwbaar gebleken door het onderschatten van de eigenlijk aanwezige concentraties (WIEBE 1971, LEE et al. 1971). Het adenosine triphosfaat (ATP), dat in alle levende cellen aanwezig en in dode cellen afwezig is, is een parameter voor de biomassa gebleken.

De quantitative bepaling van ATP maakt gebruik van de volgende reactie, waarin één lichtphoton uitgezonden wordt voor elk molecuul ATP, dat gehydrolyseerd wordt (SELINGER & McELROY 1960):



Deze photonen kunnen met behulp van een scintillatieteller (SCHRAM 1969, KARL & LAROCK 1975, LEE et al. 1971) of een fotometer (HOLM-HANSEN & BOOTH 1969, KARL & HOLM-HANSEN 1978) gemeten worden.

ATP metingen om microbiële biomassa te schatten zijn toegepast voor de waterkolom (in de diepzee HOLM-HANSEN & BOOTH, 1966, HOLM-HANSEN 1969, 1970, 1973, in een meer HOLM-HANSEN & PAERL 1973, in een estuarium MANUELS & POSTMA 1974) en voor het sediment (in zee ERNST 1970, YINGST 1978, in de diepzee ERNST & GOERKE 1974, HODSON et al. 1976, in een meer LEE et al. 1971b, op land AUSMUS 1973, v.d. WERF 1978 en in een zout moeras CHRISTIAN 1975).

De door HOLM-HANSEN & BOOTH (1966) ontwikkelde methode

voor de extractie voor ATP met behulp van kokende Tris-buffer is succesvol op watermonsters toegepast. Wanneer echter sediment op deze wijze met behulp van kokende Tris-buffer geextraheerd wordt levert dit strijdige resultaten (ERNST 1970, AUSMUS 1973).

Verschillende verbeterde en andere technieken om ATP uit sediment te extraheren zijn ontwikkeld en vergeleken.

Deze methodes zijn in twee groepen in te delen:

1. Extractie met behulp van kokende buffers zoals kokende NaHCO_3 (CHRISTIAN et al. 1975) en kokende Tris-buffer (ERNST 1970).
2. Extractie met behulp van koude zuren zoals H_2SO_4 (LEE et al. 1971a), H_2SO_4 - EDTA (KARL & LAROCK 1975), en H_2SO_4 - oxaalzuur CUNNINGHAM & WETZEL, in press).

Zowel LEE, AUSMUS, KARL & LAROCK als CUNNINGHAM kwamen tot de conclusie, dat met niet verhittende zuur extractie methodes betere resultaten verkregen werden, dan met kokende buffers. Dit komt volgens KARL & LAROCK (1975) doordat de sediment deeltjes thermische gradiënten vormen, die de cellen beschermen en de extractie remmen. De zwavelzuur extractie methode brengt echter een grotere variabiliteit in de meetresultaten met zich mee (BANCROFT 1976) en doet de concentratie ionen, die de bioluminiscentie reactie van het luciferine-luciferase remmen (STREHLER & TOTTER, 1952, KARL & LAROCK 1975) sterk toenemen. De zuur extractie methode vereist dan ook verdunning van het extrakt en een manier om een groot deel van de kationen te verwijderen bijvoorbeeld door kationen uitwisseling (LEE et al. 1971), kationen binding door EDTA (KARL & LAROCK 1975), oxaalzuur precipitatie (CUNNINGHAM & WETZEL, in press) of met behulp van een houtskool kolom (HODSON et al. 1976).

Hoewel quantitative biomassa bepalingen bruikbaar zijn voor veel oecologische studies, vertellen ze niets over de biochemische activiteit van de aanwezige organismen. ATKINSON (1965) suggereerde, dat de verhouding tussen adenosine nucleotide (ATP, ADP en AMP) concentraties een belangrijke regulerende faktor zou zijn tussen energie leverende en energy vragende processen. Dit heeft geleid tot de definitie van de Energy Charge (EC) van het adenylaat systeem, als de helft van het gemiddelde aantal an hydride gebonden fosfaat groepen per adenine deel:
$$EC = \frac{\{ATP\} + \frac{1}{2} \{ADP\}}{\{ATP\} + \{ADP\} + \{AMP\}} \quad (\text{ATKINSON 1968})$$

De EC is een lineaire maat voor de hoeveelheid metabolisch beschikbare energie. Zij geeft geen informatie over de absolute groei, maar het blijkt, dat de mate van proteïne synthese en de capaciteit tot groei meer gevoelig is voor veranderingen in de waarde van de EC, dan voor veranderingen in de concentratie ATP (SWEDES, 1975). Verschillende EC bepalingen zijn zowel in plankton monsters (BAMSTEDT & SKJOLDAL, 1976, SKJOLDAL & BAMSTEDT, 1976) in zeewater (KARL & HOLM-HANSEN 1978) als in multicellulaire organismen en strandzand (KARL et al. 1978) gedaan. De meest gebruikte methode, waarbij zowel ADP als AMP enzymatisch omgezet wordt is reeds beschreven door PRADET (1967) en CHAPMAN et al. (1971). Door KARL & HOLM-HANSEN (1978) is deze techniek voor lage adenine nucleotide concentraties aangepast.

In de Waddenzee wordt onder invloed van de getijden stroom grote hoeveelheden particulier organisch materiaal uit de Noordzee de Waddenzee binnen gevoerd (POSTMA 1954). Deze aanvoer is ongeveer drie maal zo groot (De JONGE & POSTMA, 1974) als de primaire produktie in de waterkolom (POSTMA & ROMMETS 1970, CADÉE & HEGEMAN 1974a) en op de droogvallende de platen (CADÉE

& HEGEMAN 1974b) van de Waddenzee. Dit zich in de Waddenzee ophopende organisch materiaal (POSTMA 1961), wordt door micro-organismen gemineraliseerd.

Het grootste deel van dit organische materiaal blijkt wanneer de Elektronen transport systeem (ETS) aktiviteit, als maat voor de mineralisatie snelheid (PACKARD, 1971), van de waterkolom met de ETS aktiviteit van het sediment vergeleken wordt, in het sediment gemineraliseerd te worden (VOSJAN, 1977).

In dit onderzoek wordt een extractie methode voor marien sediment ontwikkeld, die gebruik maakt van een "nucleotide releasing" reagens. Deze methode wordt met de Tris-kook methode van ERNST (1970) vergeleken.

Vervolgens wordt de vertikale verdeling van de biomassa in het sediment van zowel een natuurlijk als een kunstmatig wad systeem beschreven en deze verdeling vergeleken met, de met behulp van ETS gemeten, Mineralisatie-snelheid.

Tenslotte wordt de Energy Charge van oppervlakte sediment bepaald.

III. MATERIAAL & METHODEN

a. Monsternamen

Sediment van het oppervlak van zowel het NIOZ-wad als wadbak-zuid (kunstmatig wad-oecosysteem) werd verkregen door bij laag water de bovenste 1-2 cm af te scheppen. Dit monster werd goed geroerd om een zo homogeen mogelijke suspensie te verkrijgen. Een sediment kern werd met behulp van een pvc-buis van 3.3 cm doorsnede en 60 cm lengte uit het sediment gestoken. Deze kern werd in plakken met een dikte van 1-2 cm gesneden, die tot een homogeen mengsel geroerd werden. De monsters werden op de dag van het experiment genomen en tot het moment van de bepaling bij 4 °C bewaard.

b. Drooggewicht bepaling van het sediment

Dit werd bepaald door een sedimentmonster gedurende 3 uur in een droogstoof (100 °C) te plaatsen. Het gewicht van het sediment werd zowel voor als na het drogen bepaald, waarna het drooggewicht berekend kon worden.

c. ATP extractie

1. Lumac methode

Bij de Lumac methode wordt gebruikt gemaakt van de volgende chemicaliën:

Lumit- Een stabiel luciferine luciferase reagens. HEPES-buffer
- Deze buffer wordt gebruikt om het Lumit reagens in op te lossen. Het is een 0,02 M HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N¹-2-ethaanzwavelig zuur) buffer (pH 7,75), die een voor de bioluminescentie geschikte hoeveelheid Mg⁺⁺ bevat. De buffer bevat tevens een agens om microbiële groei te onderdrukken.

NRS (Nucleotide Releasing reagens voor Somatische cellen)-
Dit reagens wordt gebruikt om nucleotiden en andere kleine molekulen uit niet microbiële cellen kwantitatief te extraheren. Deze kleine molekulen worden binnen enkele seconden vrijgemaakt uit de cellen, terwijl grote molekulen als proteïnen en enzymen binnen de cel blijven. Doordat NRS alleen de celwand aantast, waarbij de cellen hun normale vorm behouden kunnen nucleotiden vrijgemaakt worden, zonder dat ze veranderd of afgebroken kunnen worden door enzymen uit de cellen. Bakteriële en gist cellen worden door het NRS niet aangetast.

NRB (Nucleotide Releasing reagens voor Microbiële cellen)-
Dit reagens extraheert nucleotiden kwantitatief binnen 15 seconden uit bacteriële en gist cellen. Deze behouden tijdens de extractie hun normale vorm, sommige somatische cellen echter, worden door het NRB gelyseerd.

Volgens Lumac Application Bulletin BA 210 508 moet sediment 1 : 10 verdund worden. Van deze suspensie wordt een monster van 100 μ l genomen, waarna een gelijke hoeveelheid (100 μ l) wordt toegevoegd. Aan dit mengsel wordt ook 20 μ l bidest toegevoegd. Het monster wordt 15 seconden na de toevoeging van het NRB gemeten. Aan een tweede monster wordt in plaats van 20 μ l H₂O, 20 μ l ATP interne standaard (100 ng/ml) toegevoegd. In tegenstelling tot de Lumac methode, die de twee monsters na elkaar neemt, worden bij deze experimenten de beide monsters tegelijk genomen. De bepaling (monster en monster + interne standaard) wordt in triplo uitgevoerd.

Methodes voor de behandeling van het monsters:

- a. Homogeniseren: 10 gram sediment werd met $\pm$ 30 ml 0,6 M mannitol aangevuld, in trilpotjes gedaan. Deze werden gedurende 1-3 min. gehomogeniseerd in de Braun-shaker. (Het eerste monster werd 3 min gehomogeniseerd en 15 min na begin homogenisatie gemeten. Het tweede en derde werden 1 min gehomogeniseerd en 10 min na homogenisatie werd het tweede gemeten, terwijl het derde direkt erna gemeten werd.
- b. Schudden: Nadat 10 gram sediment met 0,6 M mannitol verdund was, werd 10 seconde voor monsternamen de oplossing geschud.
- c. Roeren: Met behulp van een magneetroerder werd het met 0,6 M mannitol verdunde monster constant geroerd.
- d. Trillen: Door middel van een glazen trilstaaf werd het met 0,6 M mannitol verdunde monster met een hoge frequentie getrild.

2. Ernst methode

Volgens ERNST (1970) werd aan 1 gram sediment 50 ml kokende 0,02 M Trisbuffer toegevoegd, hiervan werd na 10 seconden extraheren 5 ml monster (in triplo) genomen. Dit werd gedurende

5' bij 3000 rpm gecentrifugeerd. Vervolgens werd de bovenstaande vloeistof afgepipetteerd. Bij een tweede monster werd een ATP standaard direkt na toevoegen van de kokende Trisbuffer Bij gepipetteerd. Bij meting van het monster in de scintillatieteller werd als ATP standaard 50 μ l (100 ng/ml) toegevoegd. Bij meting in de Lumac celltester werd als standaard 0,5 ml (1 μ g/ml) ATP toegevoegd.

Een ATP ijklijn werd met behulp van verschillende ATP verdunningen gemaakt. Het percentage ATP, dat verloren was gegaan kon berekend worden door de gevonden counts (of RLU'S = Relative lights Units) van de ATP standaard te vergelijken met het aantal counts (of RLU'S) gevonden op de ijklijn bij de zelfde concentratie ATP.

d. ATP meting

1. Met de Lumac celltester

Bij meting in de Lumac celltester (model 1030) werd minstens 30 min. na het aanzetten van de celltester deze zo ingesteld, dat na 40 seconden geïntegreerd meten zonder monster het aantal RLU'S niet meer dan 0,05 bedroeg. Wanneer de zogenaamde drift in de loop van het experiment groter werd, werd deze alsnog bijgesteld. Bij meting van het monster (220 μ l) werd 2,4 sec nadat 100 μ l Lumit geïnjecteerd was (door de celltester), gedurende 40 seconden het aantal RLU'S geïntegreerd.

2. Met de scintillatieteller

Bij meting in de scintillatieteller (Nuclear Chicago Mark I) werd het monster op een meetbaar volume gebracht door de Lumit 1 : 10 met 0,02 M Tris of HEPES buffer te verdunnen. Dit mengsel werd 20 seconden na bij elkaar volgen gedurende 40 seconden in de scintillatieteller gemeten (MANUELS, 1973).

- e. Berekening van de ATP concentraties bij gebruik
making van een interne standaard

Dit gebeurt op de volgende wijze.

$$\text{ng ATP/monster} = \frac{x \cdot A}{B - A},$$

waarbij A = RLU'S (of counts) van het monster,

B = RLU'S (of counts) van het monster +
interne standaard,

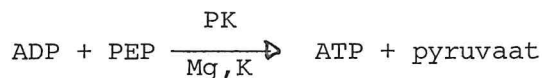
X = ng ATP, toegevoegd als interne standaard.

Door deze concentratie te corrigeren voor de gebruikte verdunning en het drooggewicht, kan de concentratie per gram droog sediment berekend worden.

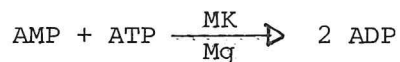
- f. Bepaling ADP en AMP en berekening van de Energy
Charge

Adenosinediphosfaat (ADP) en Adenosinemonophosfaat (AMP) kunnen op een indirecte manier gemeten worden door het enzymatisch om te zetten in ATP.

ADP wordt met behulp van pyruvaatkinase (PK) en fosfoenolpyruvaat (PEP), in aanwezigheid van K^+ en Mg^{++} ionen omgezet volgens de volgende reactie:



AMP wordt eerst in ADP omgezet met behulp van myokinase (MK) in aanwezigheid van Mg^{++} ionen, waarna dit weer tot ATP wordt omgezet. De volgende reacties vinden plaats:



De enzymen werden in de volgende oplossingen toegevoegd:

Oplossing A: 75 mM KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 7,3) en 15 mM MgSO_4 .

Oplossing B: oplossing A met daaraan toegevoegd 0,5 mM PEP (Koch-light) en 1,14 μl PK (Koch-light) per 50 μl oplossing.

Oplossing C: oplossing B met daaraan toegevoegd 2,78 μl MK (Koch-light) per 50 μl oplossing.

Het sediment (10 gram) werd 1:10 met 10,8 % Mannitol verdund en gedurende 15 min. getrild. Daarna werden aan 4 verschillende reageerbuizen monsters toegevoegd. Buis 1: voor de ATP bepalingen werd 100 μl monster plus 100 μl monster voor de interne standaard genomen, hieraan werd 200 μl NRB en 100 μl oplossing A toegevoegd. Buis 2: voor de ATP + ADP bepalingen werd 100 μl monster plus 100 μl monster voor de interne standaard plus 100 μl monster om de efficiency van de ADP bepaling te bepalen genomen. Hieraan werd 300 μl NRB en 150 μl oplossing B toegevoegd.

Buis 3: voor de ATP + ADP + AMP bepaling werd 100 μl monster genomen plus 100 μl NRB + 50 μl oplossing C. Buis 4: voor de tweede ATP + ADP + AMP bepaling werd 100 μl monster + 100 μl voor een interne standaard genomen. Hiervan werd 200 μl NRB toegevoegd plus 100 μl oplossing C, waaraan een bepaalde hoeveelheid ATP toegevoegd was, om een overmaat aan ATP te hebben, zodat de reactie $\text{AMP} \rightarrow \text{ADP}$ efficiënter zou verlopen (KARL & HOLM-HANSEN, 1978).

Deze mengsels werden 30' bij 30 °C geïncubeerd, waarna de ATP concentratie gemeten werd. Als interne standaard werd 2,5 of 10 ng ATP toegevoegd.

Het ADP en AMP gehalte wordt berekend door respectievelijk de gevonden ATP en ATP+ADP concentratie van de gemeten waarde af te trekken. De Energy Charge wordt berekend met behulp van de berekende concentratie per g dr. sed.

ETS meting : Electronen transport systeem (ETS) aktiviteit werd gemeten met de methode, zoals beschreven is door OLAŃCZUK-NEYMAN & VOSJAN (1977).

IV. EXPERIMENTEN EN RESULTATEN

a. IJklijnen van de Lumac-celltester

Door middel van ATP ijklijnen werd het verband bepaald tussen het aantal RLU's en de concentratie ATP. Concentraties ATP (200 μ l, in bidest verdund) van 0,05 - 500 ng/ml werden zowel met een integratietijd van 10 sec (Int 10) als 40 sec (Int 40) gemeten. Bij Int 40 bleek 5 ng (25 ng/ml) reproduceerbaar te meten te zijn, terwijl dit bij Int 40 1-2ng (5-10 ng/ml) was. Wanneer het monster 10 sec geïntegreerd werd, bleek grafische uitzetting van de hoeveelheid toegevoegde ATP tegen het aantal RLU's een verband op te leveren, dat overeen kwam met de rechte lijn $y = 0,03 x - 0,067$ en een regressiecoëfficiënt van 0,9977. Bij Int 40 was dit $y = 0,117 x + 0,037$ ($r = 0,999$) en $y = 0,106 x - 0,073$ ($r = 0,9995$) (zie Fig. 1). Alle 3 de grafieken hebben een kleine afwijking ten opzichte van het 0-punt. Bij verdunning van het ATP in 50 % zeewater werd bij Int 40 $y = 0,03 x - 1,71$ ($r = 0,915$) gevonden. De afwijking ten opzichte van het 0-punt is groter, dan die van de in bidest verdunde ijklijn, terwijl de helling van de hoek en de regressiecoëfficiënt kleiner zijn.

b. Scheiding van bacteriën en algen door middel van NRS en NRB

Het NRS extraheert (volgens Lumac) alleen nucleotiden van somatische cellen. Het NRB extraheert bacteriële en gistcellen. Om de mogelijkheid te onderzoeken of met behulp van deze specifieke reagentia algen (somatisch?) van bacteriën (microbieel)

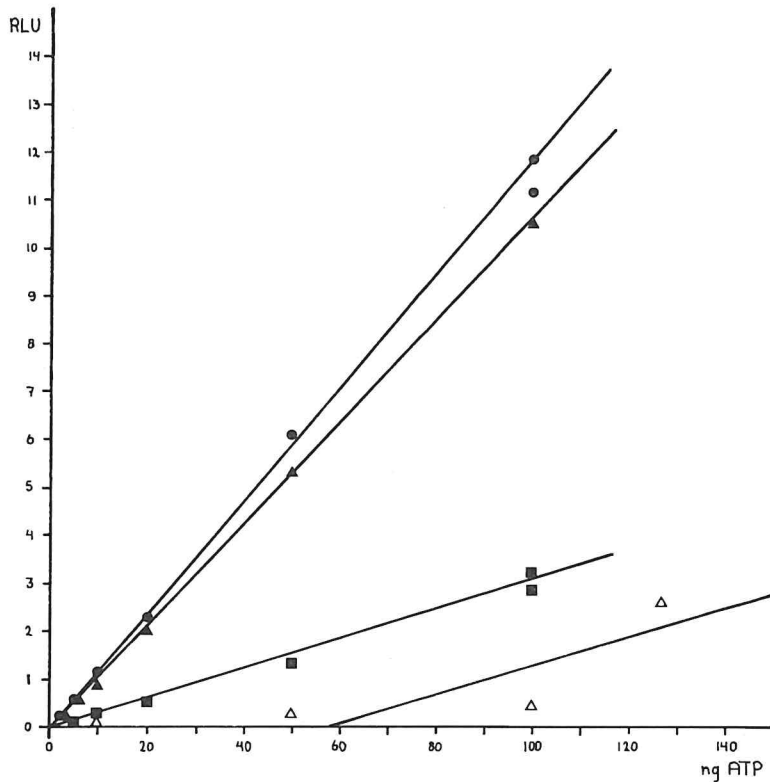


Fig. 1. Grafisch verband tussen RLU's en toegevoegde hoeveelheid ATP.
 ● en ▲ - in bidest verdund ATP, gemeten bij Int 40; ■ - in bidest verdund ATP, gemeten bij Int 10; Δ - in 50 % zeewater verdund ATP, gemeten bij Int 40.

gescheiden konden worden, werden enkele experimenten gedaan met een gemengde algen-bacterie culture. Als controle werd ook een bacterie-culture gemeten. Wanneer zowel bij de algen-bacterie culture als de bacterie culture NRS werd gevoegd, konden nauwelijks RLU's gemeten worden. Na toevoeging van NRB was dit wel mogelijk (zie Tabel I).

Volgens Lumac konden bij aanwezigheid van grote hoeveelheden somatische cellen, deze eerst met behulp van NRS ge-extraheerd en gefiltreerd worden. De op het filter achtergebleven microbiële cellen konden vervolgens met NRB geextraheerd

Tabel I

Extractie van ATP van bacterie en bacterie-algen cultures doormiddel van NRS en NRB, uitgedrukt in RLU's.

	Ongefiltreerd		Gefiltreerd				
			Filtraat			Filter	
	NRB	NRS	NRB	NRS	H ₂ O	NRB	NRS
Bakt	5,7	0,5					
	5,8	0,05					
Algen +	0,42	-0,03					
Bakt	0,38	-0,07					
	0,40	-0,04					
			0,21	0,07	0,05	0,73	0,46
	0,2	0,05					
	0,2	0,03					
			0,18			0,04	
			0,13			0,22	
					0,04	1,32	
					0,03	1,20	

en gemeten worden. Zowel het filter als het filtraat werden gemeten. De resultaten waren zeer wisselend (zie Fig. 1).

c. Behandeling van het sedimentmonster

1. Oplosmiddel

Nadat het sediment volgens Lumac voorschrift 1:10 met bidest verdund en gemeten was, bleek het aantal RLU's in de tijd af te nemen. Daar het monster in een hypotonisch milieu werd gebracht kon een groot deel van de cellen openbarsten, waardoor ATP'ases in oplossing konden komen.

Het gevolg van het in oplossing komen van deze ATP'ases is een snelle afbraak van het ATP. Wanneer het sediment met zeewater (isotonisch) verdund werd, was het aantal RLU's zeer klein, dit als gevolg van de hoge concentratie Cl⁻ ionen, die een remmende werking op het luciferine - luciferase systeem hebben (STREHLER & TOTTER, 1952, KARL & LAROCK, 1975). Als

Tabel II

ATP concentraties en standaarddeviaties van sedimentmonsters, gemeten op verschillende tijdstippen na verdunning. Tijd = tijd, waarin meting plaatsvond na toevoeging van mannitol; $\bar{x}$ = gemiddeld gemeten ATP concentratie; $\bar{s}$ = standaarddeviatie.

	Tijd(min)	$\bar{x}$	$\bar{s}$ (%)	Tijd(min)	$\bar{x}$	$\bar{s}$ (%)
0,5 M mannitol	1-18	946	225 (24)	18-40	755	40 (5)
0,5 M mannitol	0,5-14	989	229 (23)	14-36	1152	188 (16)
	1-18	2282	904 (40)	18-40	1393	278 (20)
0,5 M mannitol	1-15	negwaarde		15-40	1624	302 (19)
0,6 M mannitol	1-15	7150	4434 (62)	15-40	426	283 (25)

oplosmiddel dat ten eerste isotonisch ten opzichte van de cellen was en daarbij ten tweede geen remming van het luciferine-luciferase plaatsvond werd mannitol gekozen. Verdunning van het sediment met een oplossing van mannitol gaf geen vermindering in de ATP concentratie te zien (zie Tabel II). Eerst werd een oplossing van 0,5 molair (gelijke molariteit t.o.v. 23^o/oo zeewater) gebruikt later een oplossing, die isosmotisch was met zeewater dat een saliniteit van 32^o/oo heeft. Dit komt overeen met een oplossing van 0,6 molair mannitol (WOLF, 1966). Om eventuele groei van bacteriën te remmen werd 50 mM KCN toegevoegd. Dit bleek geen negatieve invloed te hebben op de ATP concentratie vergeleken met het monster zonder toevoeging.

Aangezien bij alle metingen de standaarddeviatie van bepalingen, die binnen 15 min na toevoeging van mannitol gedaan waren, groter was, dan de standaarddeviatie van bepalingen, na 15 min gedaan, werd besloten het monster voor de bepaling pas na 15 min trillen te nemen.

2. Adsorptie aan het sediment

By metingen van ATP in het sediment is een groot probleem het niet kunnen meten van ATP door adsorptie aan het sediment

en irreversibele bindingen van fulvine zuur aan het ATP (CUNNINGHAM & WETZEL, in press). Er werd geprobeerd om zoveel mogelijk bacteriën en algen in oplossing te krijgen, voordat het ATP vrijgemaakt wordt (door NRB). Wanneer de algen en bacteriën in oplossing zijn, zal het NRB makkelijker in kunnen werken. Als het monster echter zeer troebel is, zullen (door doving) weinig RLU's gemeten kunnen worden. Er werd geprobeerd een methode te verkrijgen, waarbij de verhouding tussen de gemeten ATP concentratie en het aantal RLU's het meest optimaal is. De volgende methodes werden vergeleken: 1. Homogeniseren, 2. Schudden, 3. Roeren, 4. Trillen. De resultaten van de verschillende methodes waren nogal wisselend (zie Tabel III). Na homogenisatie met de Braun-shaker werd, vergeleken met het geschudde monster, veel ATP gemeten; de spreiding daarentegen van het geschudde monster was kleiner. De homogenisatie met behulp van de Braun-shaker had verder als nadeel, ten eerste, dat hij nogal bewerkelijk was en ten tweede, dat door het zeer heftige schudden de cellen kapot getrild konden worden. Het is mogelijk, dat zowel kleine (ATP) als grote molekulen (ATP'ases, pyruvaat-kinases) in oplossing kunnen komen. Hydrolysering en afbraak van het ATP door ATP'ases kunnen hierdoor plaatsvinden. Dit waren ook de redenen waarom van homogenisatie afgezien werd. De methoden onder punt 2 t/m 4 gaven geen duidelijke aanwijzing om een van de methoden boven de anderen te prefereren. De gevonden concentraties ATP waren niet erg constant. Bij verschillende monsters gaven verschillende methodes het hoogste percentage ATP. De standaarddeviaties waren ook aan nogal wat spreiding onderhevig. Bij gebruik van High Sensitivity Lumit bleken 3-4 maal meer RLU's per 2ng standaard ATP gemeten te worden. Er werd besloten om het monster met behulp van een trilstaaf

Tabel III

Resultaten van ATP extractie bij behandeling van wadbaksedimentmonsters, gemeten na behandeling volgens verschillende methodes. $\text{RLU} \cdot 2\text{ng}^{-1}$ = RLU's per toegevoegde interne standaard (2ng) $\text{ngATP} \cdot \text{g.drsed}^{-1}$ = gemiddelde ATP concentratie per gram droog sediment s = standaarddeviatie; * - sedimentmonster gemeten met High Sensitivity Lumit.

		$\text{RLU} \cdot 2\text{ng}^{-1}$	$\text{ngATP} \cdot \text{g.drsed}^{-1}$	$\bar{s}$	
				(mg)	(%)
10-7	Braun-shaker 1	0,38	2269	530	23,4
	Schudden	0,778	787	89	11,3
11-7	Braun-shaker 2	0,518	380	37	9,6
	Braun-shaker 3	0,550	537	74	13,7
	Schudden	1,117	374	40	3,8
27-7	Trillen	1,216	481	54	11,3
		1,140	417	37	8,8
		1,170	368	16	4,3
	Roeren	1,216	280	37	13,1
		1,114	315	6	1,8
		1,036	352	22	6,2
	Schudden	1,376	316	24	10,9
		1,422	219	27	12,2
		0,95	329	9	2,9
8-8	* Trillen	4,03	531	64	12
		3,83	526	17	14,1
		3,8	809	254	31,4
	* Schudden	2,5	1020	532	52,2
		3,3	578	116	20,1
		2,9	522	444	51,9

te behandelen, omdat ten eerste bij trillen waarschijnlijk meer bacterien en algen "in oplossing" gaan, dan door te schudden of te roeren. Ten tweede werden bij trillen meer RLU's in hetzelfde monster gemeten, dan op de andere wijzen. Bij lagere ATP concentraties (bijvoorbeeld dieper in de wadbodem) ligt het aantal RLU's zo langer binnen het meetbereik (I 0,1 RLU) van het apparaat.

3. Invriezen van het sedimentmonster

Om te bepalen of het mogelijk is monsters gedurende een bepaalde tijd te bewaren, werd een monster in vloeibare N_2 in-

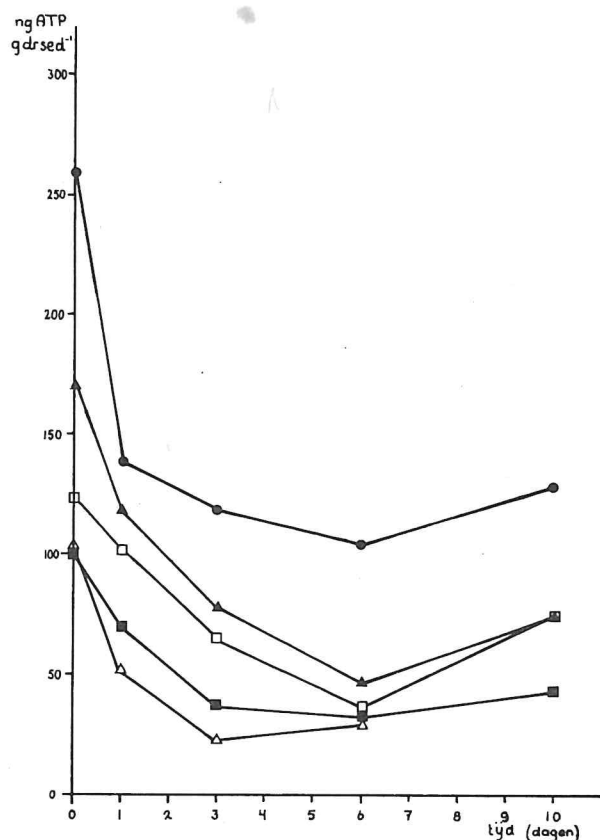


Fig. 2. ATP concentratie van ingevroren sedimentmonsters van verschillende dieptes, uitgezet tegen de tijd waarin het monster ingevroren is. ● - monster 0-10 mm; ▲ - monster 10-20 mm; ◻ - monster 30-50 mm; ■ - monster 60-80 mm; Δ - monster 160-180 mm. Bij berekening van de concentraties ATP. g dr sed⁻¹ werd aangenomen, dat het drooggewicht van de ingevroren monsters hetzelfde was, als die van de oorspronkelijke monsters (op t=0).

gevroren. Dit werd met het doel gedaan, dat alle monsters tegelijk genomen zouden kunnen worden, om een optimale vergelijking mogelijk te maken. ATP concentraties in sedimentmonsters werden op de dag van de monsternamen zelf en 1, 3, 6 en 10 dag(en) na invriezen gemeten (zie Fig. 2). Bij vergelijking met het direkt gemeten monster bleek de concentratie ATP vooral de eerste 3 dagen sterk af te nemen. De volgende dagen bleef deze redelijk constant.

Tabel IV

Resultaten van ATP extractie bij verschillende verdunningen van het wad-
baksedimentmonster. De verdunning van het monster is de verhouding monst-
er: mannitol; $\text{RLU} \cdot 2\text{ng}^{-1}$ = RLU's per interne standaard.

Verdunning sedimentmonster	RLU monster	RLU 2ng^{-1}	ng ATP (g dr sed $^{-1}$)
1:1	0,09	niet te meten	-
1:5	0,737	0,23	550
1:10	2,073	0,44	1520
1:20	2,043	2,327	565

4. Verdunningsfaktor van het monster

De verdunningsfaktor van het monster bleek niet evenredig met het aantal gevonden RLU's en de doving van het monster. Bij verschillende verdunningen (1:1, 1:5, 1:10, 1:20) werd het aantal RLU's gemeten en het ATP concentratie berekend (zie Tabel IV). Bij de verdunningsfaktor 1:1 kon geen ATP concentra-
tie bepaald worden. Het aantal RLU's van het monster was zo laag, dat aan deze waarden nauwelijks enige betrouwbaarheid toegekend kunnen worden. Aangezien het hoogste percentage ATP gevonden wordt bij een verdunning van 1:10 is deze verder aan-
gehouden.

d. Interne standaard

Aangezien het optimale standaard volume (volgens Lumac) ± 5 procent van het totaal toegevoegde volume (300 μl) is, werd 20 μl toegevoegd. Verder moet volgens Lumac de concentratie van de interne standaard zo gekozen worden, dat het aantal RLU's van de interne standaard en het monster ongeveer even groot is. De meest geschikte concentratie interne standaard werd bij een verdunningsfaktor 1:10 bepaald door zowel 0,5 ng; 2 ng; 5ng als 20 ng aan een monster toe te voegen (zie Tabel V). Het verband tussen RLU's en de concentratie was lineair. Bij toevoeging van

Tabel V

Resultaten bij toevoeging van verschillende interne standaards aan het wadbaksedimentmonster.

ng ATP· standaard ⁻¹	RLU monster	RLU standaard ⁻¹	ng ATP· (g dr sed ⁻¹	s (%)
0,5	2,253	negatief	-	-
2	2,073	0,44	1520	214 (14)
5	2,12	2,03	821	66 (8)
20	2,153	7,91	859	58 (7)

2 ng werd het hoogste percentage ATP gemeten. Hoewel de standaarddeviatie bij 2 ng groter was, dan bij 5 ng en het aantal RLU's van de interne standaard niet even groot is, als die van het monster werd toch besloten om deze concentratie aan te houden. Wanneer metingen gedaan werden met een kleinere ATP concentratie (minder RLU's) zou deze concentratie interne standaard ook nog te gebruiken zijn. De verhouding RLU's standaard: RLU's monster wordt dan immers niet al te groot.

e. Vergelijking van de ATP concentratie van verschillende methoden op verschillende apparatuur

ATP bepaling volgens Tris-kook methode op de scintillatieteller en volgens Lumac methode op Lumac celltester: Na koken bleek 96,6 % van het ATP na vergelijking met de ijklijn verloren gegaan te zijn. Dit verlies is het gevolg van het koken als ook van doving omdat de monsters, welke gebruikt zijn voor de ijklijn, niet gekookt waren. De ATP ijklijn bleek bij hoge concentratie (> 0,125 ng/ml) niet lineair meer te zijn en het aantal counts nam bij een concentratie van 0,25 ng/ml zelfs af. Ten gevolge hiervan was het niet mogelijk met behulp van de ATP ijkcurve rechtstreeks het percentage ATP te berekenen, dat in het oorspronkelijke monster, voor Tris-extractie zat. Aan-

gezien slechts 3,4 % ATP overgebleven was na Tris koken, was het op de ijklijn gevonden percentage ATP ook slechts 3,4 %. Op deze manier kon het oorspronkelijke monster (100 %) toch berekend worden. Dit kwam overeen met $160 \text{ ng ATP} \cdot \text{g dr sed}^{-1}$. Wanneer het monsters geschud en in de Lumac celltester gemeten werd, was de gemeten concentratie $304 \text{ ng ATP} \cdot \text{g dr sed}^{-1}$.

ATP bepaling volgens Lumac methode, zowel in de Lumac celltester als in de scintillatieteller: Na het monster geschud te hebben werd in de scintillatieteller $680 \text{ ng ATP} \cdot \text{g dr sed}^{-1}$ gemeten. Bij schudden, roeren en trillen werd in de Lumac celltester respectievelijk 540, 777 en $680 \text{ ng ATP} \cdot \text{g dr sed}^{-1}$ gemeten.

Tris-kook methode en Lumac methode vergelijken op de celltester: Bij de Trisbepaling in de celltester werd $119 \text{ ng ATP} \cdot \text{g dr sed}^{-1}$ gevonden. Bij het koken bleek na vergelijking van het monster met de ijkcurve geen of nauwelijks ATP verloren te zijn. Dit is tegenstelling tot eerdere metingen. Bij trillen of schudden van het monster werd respectievelijk 257 en $600 \text{ ng ATP} \cdot \text{g dr sed}^{-1}$ (trillen) en 342 en $346 \text{ ng ATP} \cdot \text{g dr sed}^{-1}$ (schudden) gemeten.

f. ATP en ETS bepalingen in het sediment

Van enkele kernen, die zowel op het NIOZ-wad als Wadbak-zuid gestoken waren, werden op verschillende dieptes ATP concentraties gemeten (zie Tabel VI). De verkregen profielen staan weergegeven in Fig. 3. De ATP concentratie van de op het NIOZ-wad genomen monsters (Fig. 3. a, c, d, e) vertonen een grote mate van correlatie. De regressie-coëfficiënt van de profielen varieert van 0,8 - 1,0. Het hoogste percentage ATP wordt in de bovenste laag gemeten en neemt snel af met de diepte. De con-

Tabel VI

ATP concentraties in de diepte op verschillende plaatsen op het NIOZ-wad en in wadbak-zuid.

Datum	Plaats	Diepte in mm	ATP ng gdrsed ⁻¹	$\bar{s}$	(%)
3-8-78	NIOZ-wad profiel	0-20	379 ±	26	(7)
		30-40	308 ±	25	(8)
		40-60	164 ±	16	(10)
		60-80	171 ±	12	(7)
		140-160	81 ±	13	(16)
		250-270	109 ±	16	(15)
7-8-78	Wadbak-zuid profiel	0-20	507 ±	113	(22)
		20-40	343 ±	48	(14)
		40-60	527 ±	158	(30)
		60-80	95 ±	10	(10)
		80-100	71 ±	11	(15)
		120-140	82 ±	11	(14)
		180-200	33 ±	3	(8)
		240-260	27 ±	2	(9)
22-8-78	NIOZ-wad profiel (pt2)	0-10	658 ±	80	(12)
		10-20	402 ±	45	(11)
		25-35	207 ±	19	(9)
		50-60	148 ±	9	(6)
		90-100	108 ±	25	(23)
		170-180	146 ±	6	(4)
23-8-78	NIOZ-wad profiel (pt3)	0-10	347 ±	77	(22)
		10-20	230 ±	16	(7)
		25-35	201 ±	11	(6)
		50-60	188 ±	16	(9)
		90-100	88 ±	12	(14)
		170-180	167 ±	12	(7)
29-8-78	NIOZ-wad profiel (pt5)	0-10	257 ±	29	(11)
		10-20	170 ±	2	(1)
		30-50	123 ±	6	(5)
		60-80	99 ±	4	(4)
		160-180	101 ±	6	(6)
		240-260	35 ±	6	(16)

concentratie ATP nam bij het NIOZ-wad op 2 cm diepte af tot 2/3 van de in de bovenste cm gevonden ATP concentratie. Bij de profielen a, d, e werd op 4-5 cm de helft van de ATP concentratie gemeten, terwijl dit bij c op 3 cm diepte slechts 1/3 gemeten werd. Dit is tevens het monster, waar aan het oppervlak

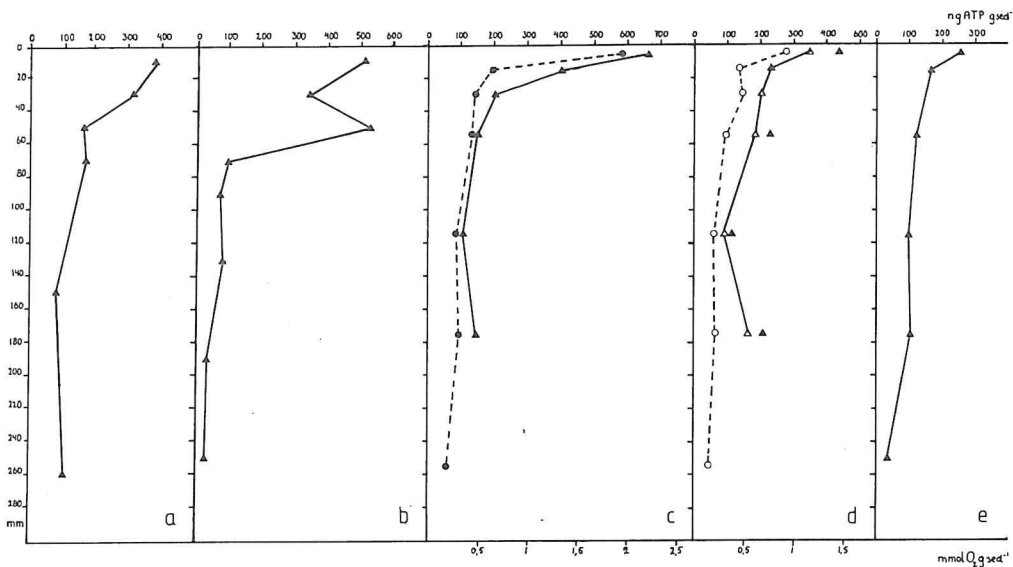


Fig. 3. Vertikale verdeling van ATP en ETS in wadsediment a. NIOZ-wad, 3-8-'78; b. wadbak-zuid, 7-8-'78; c. NIOZ-wad (punt 2), 22-8-'78; d. NIOZ-wad (punt 3), 23-8-'78; e. NIOZ-wad (punt 5), 29-8-'78. $\blacktriangle$ - ng ATP. g.dr sed⁻¹; Δ - ng ATP. g.nat sed⁻¹; $\bullet$ - ETS-aktiviteit (mmol O₂). g.dr sed⁻¹; $\circ$ - ETS-aktiviteit (mmol O₂). g.nat sed⁻¹.

de hoogste ATP concentratie (> 650 ng ATP·g dr sed⁻¹) gemeten werd.

Tussen de monsters van het NIOZ-wad en dat van de wadbak was een veel kleinere correlatie-coëfficiënt, dan tussen de NIOZ-wad profielen onderling nl. 0,57 - 0,83. In het wadbak monster werd ook een veel hogere ATP concentratie (ten opzichte van het oppervlakte monster) op veel grotere diepte gemeten. Op ± 5 cm was de concentratie ATP ongeveer even groot als de concentratie in de oppervlakte laag. Deze concentratie nam met de diepte snel af. Op 7 cm diepte was nog slechts 1/5 van deze concentratie aanwezig.

Van twee monsters (c en d) werd ook de ETS-aktiviteit bepaald. De correlatie-coëfficiënt tussen ETS en ATP is voor c en d respectievelijk 0,946 en 0,950. Hieruit blijkt, dat de verdeling van de ETS-aktiviteit en de ATP concentratie een

grote overeenkomst vertoont.

g. Bepaling ATP, ADP, AMP en berekening van de Energy Charge

Voor zowel ATP, ADP als AMP bepalingen werden in eerste instantie uit het verdunde getrilde sediment 2 aparte monsters per bepaling genomen. Bij 200 μl oplossing C werd 10 μl ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) toegevoegd. 50 μl hiervan werd aan het te bepalen monster toegevoegd (2,27 ng ATP). Na incubatie van alle monsters werd het aantal RLU's bij de eerste twee experimenten (Tabel VII 1,2) direkt gemeten. Bij deze bepalingen was het aantal RLU's per toegevoegde interne standaard (2ng) erg laag, waardoor soms nauwelijks of geen verschil met het monster gemeten werd. De uiteindelijk gevonden percentages ATP waren ook aan zeer veel spreiding onderhevig zodat de ADP en AMP concentraties niet altijd te berekenen waren. Bij de volgende experimenten (Tabel VII 3-5) werden de monsters na incubatie gedurende 5' bij 4000 rpm gecentrifugeerd, zodat het sediment en de geextraheerde cellen gepelletteerd werden. Bij het derde experiment werd een Energy Charge (EC) van 0,415 gevonden. Omdat de variatie in het aantal RLU's, vooral bij de bepaling van de totaal aanwezige nucleotiden, groot was, werd besloten slechts één monster te nemen, waaraan een triplo bepaling gedaan werd. Aan 450 μl oplossing C werd 50 μl ($1\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) ATP toegevoegd ($\sim 4,3$ ng ATP per bepaling). Als interne standaard werd zowel 5 ng als 10 ng ATP toegevoegd. Het gemeten aantal RLU's van de interne standaard van 5 en 10 ng was ongeveer evenredig. Bij de meting van het totale adenine nucleotide gehalte, was het aantal RLU's van de interne standaard bij beide experimenten echter kleiner, dan bij de overige twee bepalingen (ATP en ATP+ADP), die qua grootte ongeveer overeen kwamen. Het gevonden ADP percentage

Tabel VII

ATP, ADP, AMP bepalingen en de berekening van de Energy Charge.

					ng · g dr sed ⁻¹						
Monster	2 ng	5 ng	10 ng	ADP	ATP	±	$\bar{s}$	(%)	ADP	AMP	EC
(RLU)	ATP	ATP	ATP								
	(RLU)	(RLU)	(RLU)								
(2 ng)											
ATP	0,75	0,25				935 ±	219	(23)			
ATP+ADP	2,89	0,13		0,055	7293	-			6358	-	-
ATP+ADP+AMP	1,89	0,33			1525 ±	437	(29)				
ATP	1,63	0,26			2381 ±	208	(9)				
ATP+ADP	2,84	0,685		0,56	1557				-	-	-
ATP+ADP+AMP	2,76	0,545			1066						
ATP	0,81	0,415			663						
ATP+ADP	1,633	0,67			2078				1415	1228	0,415
ATP+ADP+AMP	2,79	0,26			3306						
(5 ng)											
ATP	0,977	0,623	1,267		1419 ±	88	(6)				
ATP+ADP	1,047	0,583	1,073	0,54	1739 ±	17	(1)		320	124	0,848
ATP+ADP+AMP	1,123	0,447	0,783		1862 ±	492	(26)				
ATP	0,87	0,65	1,317		1382 ±	193	(14)				
ATP+ADP	1,167	0,603	1,313	0,51	1819 ±	87	(5)		437	1209	0,520
ATP+ADP+AMP	1,167	0,40	0,81		3078 ±	448	(15)				

varieert, bij de berekening met behulp van 10 ng interne standaard, van 23-32 % van de aanwezige ATP concentratie en van 15-17 % van de totale adenine nucleotiden concentratie. Bij de AMP concentratie lag dit respectievelijk tussen de 9-91 % en 7-40 %. Bij deze laatste meting was de spreiding in deze gevonden concentratie ook veel hoger (zie Tabel VII). De gevonden EC's waren respectievelijk 0,846 en 0,520.

Tegelijkertijd werden ook ATP bepaling gedaan op de Lumac-methode (zie Tabel VIII). Hoewel er beduidend meer RLU's gemeten werden op de Lumac methode, waren de ATP concentraties lager, dan die gevonden werden bij de berekening van de EC.

Tabel VIII

Vergelijking van getrild en bij EC bepaling geincubeerd wadbaksediment-monster. Std = aantal RLU's per toegevoegde interne standaard (2ng of 5ng).

Geincubeerd				Getrild			
Monster (RLU)	Std (RLU)	ng ATP gdrsed ⁻¹	s%	Monster (RLU)	Std (RLU)	ng ATP gdrsed ⁻¹	s%
(2ng)				(2ng)			
0,75	0,25	935	23	11,3	5,0	600	13
1,63	0,26	2381	9	6,4	1,75	1156	26
(5ng)				(5ng)			
0,977	0,623	1489	9	3,93	3,1	1004	17
1,167	0,603	1427	19	3,17	3,23	803	5

V. DISKUSSIE

De gevonden ijklijnen op de Lumac-celltester laten een rechtlijnig verband over het gehele gemeten gebied tussen de ATP concentratie en het aantal RLU's zien (zie Fig. 1.). De helling van de bij Int 40 gemeten in bidest verdunde concentraties ATP is in beide gevallen bijna even groot, wat op stabiliteit van het apparaat duidt. Het met zeewater verdunde monster geeft bij eenzelfde ATP concentratie veel minder RLU's en ook een kleinere regressiecoëfficiënt. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de inhiberende werking van de in zeewater aanwezige ionen op het luciferine-luciferase (KARL & LA ROCK, 1975). Omdat het mogelijk was bij Int 40 lagere concentraties ATP reproduceerbaar te meten, werden alle sediment monsters met Int 40 gemeten.

Het bleek niet mogelijk algen en bacteriën in een culture van elkaar te scheiden (zie Tabel I). Het aanwezige ATP in het filtraat leek eerder het gevolg van de filtratie, waardoor de cellen kapot gingen, dan het gevolg van extractie van ATP door

NRS. De sediment monsters werden daarom alleen geëxtraheerd met NRB, waardoor zowel algen als bacteriën gemeten werden.

Het meten van ATP in sediment wordt bemoeilijkt, omdat de te meten organismen niet door filtratie te concentreren zijn, zoals bij watermonsters (HOLM-HANSEN & BOOTH, 1966). Verder is een probleem het zoeken naar een geschikt extractie middel om ATP uit sediment te extraheren en de effecten te miniseren van stoffen die het ATP binden, zoals fulvine zuur (CUNNINGHAM & WETZEL, in press) of het luciferine-luciferase remmen, zoals sommige ionen (KARL & LA ROCK, 1975 en HODSON et al 1976).

Bij de eerste extractie methoden (ERNST, 1970, LEE et al. 1971), CHRISTIAN, 1973, KARL & LA ROCK, 1975) wordt een extract verkregen, waarbij met behulp van een ijklijn gecorrigeerd wordt voor verlies van ATP in de oorspronkelijke concentratie ATP berekend wordt. Na het verkrijgen van dit extract, moet meestal nog een extra procedure ingevoerd worden om de ion concentratie te verminderen, zoals kationen uitwisseling (LEE et al. 1971a) of precipitatie (CUNNINGHAM & WETZEL, in press). De lichtemissie in de reactie neemt immers lineair af met de log van de ion concentratie (behalve Mg^{++}) (KARL & LA ROCK 1975). Niet alleen anorganische stoffen hebben een inhiberende invloed, organische stoffen als fulvine zuur (CUNNINGHAM, in press en v. WIJNGAARDEN, 1977) remmen de lichtemissie door vorming van een irreversibel fulvinezuur- ATP complex, dat niet in staat is met het luciferine-luciferase systeem te reageren.

Bij de hier gebruikte methode wordt het monster voor de extractie verdund, zodat zowel de ion- als de fulvinezuur- concentratie verdund wordt. Na extractie wordt een bekende hoeveelheid ATP (interne standaard) toegevoegd, om zo voor de

remmende werking van ionen, fulvinezuren en de troebelheid van het monster te corrigeren. Het maken van een ijklijn, om de oorspronkelijke ATP concentratie te berekenen is dan ook niet nodig.

Bij verdunning van het monster in bidest, werd een snelle afname van ATP, direkt na verdunning, gevonden. Met in oplossing komen van ATP'ases, waardoor het ATP omgezet wordt met als eerste stap de vorming van ADP lijkt een redelijke verklaring. Wanneer het monster in een isotonische oplossing van mannitol gebracht wordt blijkt de ATP concentratie niet meetbaar af te nemen. Indien 15' na verdunning van het sediment de ATP concentratie gemeten wordt, is de standaarddeviatie veel kleiner, dan wanneer direkt met de meting begonnen wordt (zie Tabel II). Waarschijnlijk kan dit worden toegeschreven aan het feit, dat pas na een bepaalde tijd een homogene suspensie verkregen is. In de tijd tussen het toevoegen van mannitol en het meten van de ATP concentratie leek geen meetbare toename van ATP door bacterie groei opgetreden te zijn, aangezien een monster met daaraan 50 nM KCN toegevoegd geen lagere ATP concentratie gaf, vergeleken met het monster zonder toevoeging. (Aangenomen werd, dat door KCN de meeste bacteriën in hun groei geremd zouden worden).

Er werd op verschillende manieren geprobeerd een homogene suspensie met zoveel mogelijk bacterien en algen in oplossing te krijgen.

Bij behandeling van het sediment monster met de Braunshaker werd een dusdanig grote variatie in ATP concentratie gevonden en kon het zeer heftig trillen het kapot gaan van de cellen voor de extractie tot gevolg hebben, dat van deze methode werd afgezien.

Er werd ook niet overgaan tot het roeren van het monster met een magneetroerder omdat het ATP gehalte beïnvloed kon zijn door aëratie (KUCNEROWICZ, 1978), die hier meer plaats vond dan bij het schudden of trillen van het monster.

Het trillen werd als standaard methode gekozen, omdat aangenomen werd, dat vergeleken met het met de hand schudden, meer aan het sediment geadsorbeerde bacterien in oplossing zouden komen, zodat het NRB makkelijker ook op de nog aan het sediment geadsorbeerde bacteriën kon inwerken. Verder was het aantal RLU's relatief groter, wat als voordeel had, dat bij lagere ATP concentraties (bijvoorbeeld dieper in de bodem) deze toch nog gemeten konden worden. Hoewel de spreiding in de bepaling van het gemeten monster groot is (bij het trillen 2-31 %, zie Tabel III), worden deze waarden ook bij anderen zoals YINGST (1978) met een gemiddelde standaarddeviatie van 24 % en CUNNINGHAM (in press) met een standaarddeviatie van 20 % gevonden. Het is niet duidelijk of de spreiding in de gevonden ATP concentraties van submonsters, die uit een sediment monster genomen zijn (zie Tabel III), het gevolg is van de methodes die niet voor een homogeen genoeg monster zorgen of inherent is aan het sediment monster zelf. CUNNINGHAM (in press) vond met een H_2SO_4 -oxaalzuur extractie ook een grote variatie in het geëxtraheerde ATP gehalte in hetzelfde sediment monster. HODSON et al. (1976) geven als verklaring voor deze variabiliteit de heterogeniteit van het sediment met betrekking tot de verdeling van macroscopische evertibraten, die ook geëxtraheerd worden wanneer het monster niet gezeefd wordt. Dit zou een significante variatie in biomassa in duplo monsters uit een sediment kunnen geven.

Uit het experiment, waarbij sediment ingevroren wordt in

in vloeibare N_2 , kan gekonkludeerd worden, dat invriezen om het monster te bewaren voor ATP bepalingen geen geschikte methode is (zie Fig. 2). Het verschil in ATP concentraties gevonden na 3 dagen en langer invriezen, is waarschijnlijk het gevolg in de homogeniteit van het monster en onnauwkeurigheid van de bepaling op zich.

Bij vergelijking van de Lumac-methode met de Tris-kookmethode van ERNST, bleek dat de Tris-extractie sterk aan variatie onderhevig was. Het percentage terug gevonden ATP varieerde van 3,4 % tot meer dan 100 %. Een mogelijk verklaring voor deze wisselende extractie is de thermische gradient theorie van KARL & LA ROCK (1975). Verder bleek het moeilijk zoals AUSMUS (1973) vermeldde geschikte standaards te vinden, die gelijktijdig met de monster meegenomen konden worden. Met de Lumac-methode werd ongeveer twee maal zoveel ATP gemeten, zowel bij vergelijking van monsters, behandeld volgens Lumac-methode en gemeten op de celltester en volgens Tris-methode en gemeten op de scintillatieteller als bij vergelijking van beide methodes op de celltester.

Bij meting op beide apparaten van het volgens Lumac ge-extraheerde monster werd op beide apparaten ongeveer gelijke ATP concentraties gemeten.

De op het NIOZ-wad gemeten ATP concentraties in de bovenste laag van het sediment variëren van 257-1126 ng ATP $\cdot$ g droog sediment⁻¹. In de wadbak-zuid werd als laagste conc 368 en als hoogste 1520 ng ATP g dr sed⁻¹ gevonden.

Wanneer deze concentraties vergeleken worden met de in de literatuur vermeldde ATP concentraties, blijken deze ongeveer in dezelfde orde grootte te liggen (zie Tabel IX).

Bij het meten van de ATP concentraties in de diepte, wordt

Tabel IX

Vergelijking ATP concentraties uit verschillende milieus. *Dit sediment is gedroogd bij 18-20 °C.

ATP conc. µg·gdrsed ⁻¹	Monsterplaats	Bron
1,5 - 9,5	Oppervlaktesediment van een meer	LEE et al. (1971)
1,2 - 9,8	Bovenste cm in een zoutmoeras	CHRISTIAN et al. (1975)
1,2 - 2,3	Oppervlaktesediment Waddenzee	v. WIJNGAARDEN (1977)
1,09 - 7,64	Bovenste cm op 14 m diepte in zee	YINGST (1978)
0,84	Sediment van een meer	CUNNINGHAM & WETZEL (in press)
0,26 - 1,13	Oppervlaktesediment NIOZ-wad	dit verslag
0,37 - 1,52	Oppervlaktesediment Wadbak-zuid	dit verslag
0,08 - 1,32*	Oppervlaktesediment op 252-5510 m diepte in diepzee	ERNST & GOERKE (1974)

de hoogste concentratie ATP in de bovenste cm's van het sediment gemeten en neemt dan snel af met de diepte (zie Fig. 3). Een dergelijke verdeling van biomassa wordt ook door YINGST (1970 op 14 m diepte in de zee en door CHRISTIAN (1975) in een zoutmoeras gevonden.

In Fig. 3 c, d en e staan profielen weergegeven, waarbij c een punt is dat het dichtst bij de kust ligt en e het verst van de kust. Hierbij lijkt de ATP concentratie met toenemende afstand tot de kust in de bovenste cm's af te nemen, terwijl de concentratie in diepere lagen op alle 3 de punten ongeveer even groot is. Aangezien het punt met de hoogste ATP concentratie bij eb langer droog staat en aan grotere O₂conc en licht intensiteit bloot staat kan dit misschien een grotere ATP produktie tot gevolg hebben. Het sediment in wadbak-zuid lijkt tot op grotere diepte dezelfde ATP concentratie als in

de bovenste cm te hebben, waarna hij zeer snel tot zeer lage concentratie ($< 100 \text{ ng ATP g dr sed}^{-1}$) afneemt.

De hoge correlatie coefficient tussen de ATP concentratie en de ETS aktiviteit duidt op een overeenkomst tussen de mineralisatie snelheid (ETS) en de biomassa (ATP). Dit zou niet het geval behoeven te zijn zoals VOSJAN (Vakbl. Biol., 1977) beschrijft, waar in een zone met zuurstof deficiëntie in de waterkolom in de Pacific hoge ETS waarden gevonden worden, maar voor de biomassa geen relatief maximum gevonden wordt.

De Energy Charge, geeft niet alleen een maat voor de eiwit synthese en capaciteit tot groei (SWEDES, 1975), maar is ook een maat voor de extractie snelheid. Bij een hoge EC zal weinig ATP omgezet zijn in ADP en AMP, dit duidt op een snelle extractie waarbij weinig hydrolyse heeft plaats gevonden. Nadat de hier gebruikte methode aangepast was (Tabel VII, IV en V), door slechts één monster te nemen, waardoor de spreiding in de bepalingen kleiner werd en een grotere interne standaard te nemen, werden EC's gevonden van 0,85 en 0,52.

De ADP concentratie uitgedrukt als percentage van de totaal aanwezige hoeveelheid adenine nucleotiden was 17 % en 15 %. De gevonden AMP concentraties waren echter 7 % en 40 %. Bij KARL et al. (1978) werd voor ADP en AMP concentraties respectievelijk 20-23 % en 10-11 % gevonden. Wanneer de ATP en ADP concentratie (zie Tabel VII) van de beide metingen met elkaar vergeleken worden, blijkt deze in beide gevallen in dezelfde orde van grootte te liggen. Hoewel de ADP en ATP bepaling redelijk lijkt te verlopen, blijkt het bepalen van de AMP concentratie heel wat moeilijker te liggen. Bij deze bepaling was de spreiding in de metingen (RLU's) ook het grootst. De spreiding in de resultaten van 2-31 % en de te bepalen AMP

concentratie die ongeveer 10 % van de totale adenine nucleotide pool is lijken het meten van de juiste AMP concentratie te bemoeilijken. Het zoeken naar een aanpassing in de methode, waardoor binnen de bepalingen minder spreiding gevonden wordt, zal zeker tot betere en meer constante EC waarden leiden.

VI. LITERATUURLIJST

- ATKINSON, D.E., 1965. Biological feedback control of the molecular level. - Science 150: 851-856.
- , 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers.-Biochemistry 7: 4030-4034.
- AUSMUS, B.S., 1973. The use of the ATP assay in terrestrial decomposition studies.-Bull. ecol. Res. Comm. Stockholm 17: 223-234.
- BAMSTEDT, V. & H.R. SKJOLDAL, 1976. Studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, W. Norway. Adenosine phosphates and nucleic acids in *Euchaeta norvegica* (Copepoda) in relation to its life cycle.-Sarsia 60: 63-80.
- BANCROFT, K.E., A. PAUL & W.J. WIEBE, 1976. The extraction and measurement of adenosine triphosphate from marine sediments.-Limnol. Oceanogr. 21 (3): 473-480.
- CADEE, G.C. & J. HEGEMAN, 1974a. Primary production of phytoplankton in the Dutch Wadden Sea.- Neth. J. Sea Res. 8 (2-3): 240-259.
- , 1974b. Primary production of the benthic microflora living on the tidal flats in the Dutch Wadden sea.-Neth. J. Sea Res. 8 (2-3): 260-291.
- CHAPMAN, A.G., L. FALL & D.E. ATKINSON, 1971. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation.-J. bact 108: 1072-1086.
- CHRISTIAN, R.R., K. BANCROFT & W.J. WIEBE, 1975. Distribution of microbial adenosine triphosphate in salt marsh sediments at Sapelo Island, Georgia - Soil Sci. 119: 89-97.
- CUNNINGHAM, H.W. & R.G. WETZEL, (in press). Fulvic acid interferences on ATP determinations in sediments.-Limnol. Oceanogr.
- ERNST, W., 1970. ATP als Indikator für die Biomassa marine Sedimente.-Oecologia 5: 56-59.
- ERNST, W. & H. GOERKE, 1974. ATP in Sediments und Nematoden der nordost-atlantischen Tiefsee.-Meteor. 18: 35-42.
- HODSON, R.E., O. HOLM-HANSEN & F. AZAM, 1976. Improved methodology for ATP determination in marine environments.-Mar. Biol. 34: 143-149.
- HOLM-HANSEN, O., 1969. Determination of microbial biomass in ocean profiles.-Limnol. Oceanogr. 14: 740-747.
- , 1973. The use of ATP determinations in Ecological Studies.-Bull. ecol. Res. Comm. Stockholm 17: 215-219.
- HOLM-HANSEN, O. & C.R. BOOTH, 1966. The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance.-Limnol. Oceanogr. 11: 510-519.
- HOLM-HANSEN, & H.W. PAERL, 1973. The applicability of ATP determination of microbial biomass and metabolic activity. In: Detritus and its ecological role in aquatic ecosystems.

- JONGE, V.N. de & H. POSTMA, 1974. Phosphorus compounds in the Dutch Wadden Sea.-Neth. J. Sea Res. 8 (2): 139-153.
- KARL, D.M., J. A. HAUGNESS, L. CAMPBELL & O. HOLM-HANSEN, 1978. Adenosine nucleotide extraction from multicellular organisms and beach sand: ATP recovery of carbon/ATP ratios.-J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 34: 162-181.
- KARL, D.M. & O. HOLM-HANSEN, 1978. Methodology and measurement of adenylate Energy Charge ratios in environmental samples.- Mar. Biol. 48: 185-197.
- KARL, D.M. & P.A. LAROCK, 1975. Adenosine triphosphate measurements in soil and marine sediments.-J. Fish. Res. Bd. Can. 32: 599-607.
- KUCNEROWICZ, F., 1978. ATP als parameter voor actief slibsystemen. (dissertatie). Ingenieursstudie Rijksuniversiteit, Gent.
- LEE, C.C., R.F. HARRIS, D.D. M. WILLIAMS, D.E. ARMSTRONG & J.K. SYERS, 1971a. Adenosine triphosphate in lake sediments: I. Determination.-Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35: 82-86.
- LEE, C.C., R.F. HARRIS, D.D.M. WILLIAMS, J.K. SYERS & D.E. ARMSTRONG, 1971b. Adenosine triphosphate in lake sediments: II. Origin and Significance.-Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35: 86-91.
- MANUELS, M.W., 1973. ATP en organische C metingen in zwevend materiaal ter bepalingen van de verhouding tussen dood en levend plankton in de Waddenzee, Eemsestuarium, Dollard en IJsselmeer. Intern verslag Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee, Texel 1973-11
- MANUELS, M.W. & H. POSTMA, 1974. Measurements of ATP and organic carbon in suspended matter of the Dutch Wadden Sea.-Neth. J. Sea Res. 8 (2-3): 292-311.
- OLAŃCZUK-NEYMAN, K.M. & J.H. VOSJAN, 1977. Measuring respiratory electron-transport-system activity in marine sediment.-Neth. J. Sea Res. 11 (1): 1-13.
- PACKARD, T.T., 1971. The measurement of respiratory electron-transport-activity in marine phytoplankton.-Journal of Marine Research 29 (3): 235-244.
- POSTMA, H., 1954. Hydrography in de Dutch Wadden Sea.-Arch. néerl. Zool. 12: 319-349.
- , 1961. Transport and accumulation of suspended matter in the Dutch Wadden Sea.-Neth. J. Sea Res. 1: 148-190.
- POSTMA, H. & J.W. ROMMETS, 1970. Primary production in the Wadden Sea.-Neth. J. Sea Res. 4 (4): 470-493.
- PRADET, A., 1967. Étude des adénosine-5'-mono, di et triphosphate dans les tissus végétaux I. Dosage enzymatique.-Physiologie vég. 5: 209-221.
- SCHRAM, E., 1969. Bioluminescence assay of ATP. In: Proceedings of symposium on scintillation counting, Boston.
- SELINGER, H.H. & W.D. McELROY, 1960. Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence.-Arch. Biochem. Biophys. 88: 136-141.
- SKJOLDAL, H.R. & V. BÅMSTEDT, 1976. Studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, western Norway. Adenosine phosphates and nucleic acids in *Meganyctiphanes norvegica* (Euphausiacea) in relationship to the life cycle.-Sarsia 61: 1-14.
- STREHLER, B.L. & J.R. TOTTER, 1952. Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. I. Substrate and enzyme determination.-Arch. Biochem. Biophys. 40: 28-41.
- SWEDES, J.S., R.J. SEDO & D.E. ATKINSON, 1975. Regulation of growth and protein synthesis to the adenylate energy charge in an adenine-requiring mutant of *Escherichia coli*.-J. Biol. Chem. 250: 6930-6938.
- VOSJAN, J.H., 1977. De mineralisatie in zee.-Vakbl. Biol. 17: 283-298.

- VOSJAN, J.H. & K.M. OLAŃCZUK-NEYMAN, 1977. Vertical distribution of mineralization processes in a tidal sediment.-Neth. J. Sea Res. 11: 14-23.
- WERF, H. v.d., 1978. Biokinetische karakterisatie van gronden en hun eventuele biologische verstoring. (dissertatie).
- WIEBE, W.J., 1971. Perspectives in microbial ecology. In: Fundamentals of ecology. Ed. by E.P. Odum, Philadelphia: W.B. Saunders Co: 484-497.
- WOLF, A.V., Ph. D., 1966. Aqueous solutions and body fluids. Their concentrative properties and conversion tables. Hoeber Medical Division, Harper and Row, publishers.
- WIJNGAARDEN, G. van, 1977. Experimenten over de invloed van sediment op het verlies van ATP by de Tris extractie methode. Boede intern verslag, 1977-2.
- YINGST, J.Y., 1978. Patterns in micro- and meiofaunal abundance in marine sediments, measured with the adenosine triphosphate assay.-Mar. Biol. 47: 41-54.

