

Rapportnummer: 847109001

Adenylate Energy Charge. I. Achtergrond  
en bepalingsmethoden

R. Luttik

D.M.L.H.A. Jacobs

W. Slooff

M.J. 't Hart

september 1985

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van de directie van het  
RIVM.

Verzendlijst

- 1 Directie van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid  
en Milieuhygiëne
- 2 Ir. Tj. Hofker
- 3 Dr. H.A.M. de Kruijf
- 4 Drs. J.H. Canton
- 5 Drs. J.C. van der Vlught
- 6 Drs. D. de Zwart
- 7-12 Archief en auteurs
- 13-14 Bureau projecten- en rapportenregistratie
- 15-20 Reserve exemplaren

Mede ter vertrouwelijke informatie aan:

- 21 Prof.Dr. J. Koeman (LH Wageningen)
- 22 Dr. K. Kersting (RIN)

INHOUDSOPGAVE:

<u>Hoofdstuk:</u>	<u>Titel:</u>	<u>Bladzijde:</u>
	Samenvatting	1
1.	Inleiding	2
2.	Achtergrond	4
3.	Bepalingsmethoden	6
3.1.	Bemonstering en conservering	6
3.2.	Extractie	7
3.3.	Enzymatische bepaling	11
4.	Aanbevelingen	13
5.	Referenties	15
	Figuur	25
	Lijst van gebruikte afkortingen	26
	Bijlage A: extractiemethoden	27
	Bijlage B: computerprogramma	32

## Samenvatting

In dit rapport wordt een literatuuroverzicht betreffende de "Adenylate Energy Charge" bepaling gegeven. In het bijzonder wordt ingegaan op de extractiemethoden en de incubatie-buffers die gebruikt worden bij de enzymatische bepaling. Tevens wordt aandacht besteed aan de achtergrond (voor en nadelen) van deze parameter en wordt er ingegaan op de bemonsteringsmethoden van de te onderzoeken organismen.

De beste resultaten, met betrekking tot de extractiemethoden, werden verkregen met Tris, TCA en PCA. Tricine, Mops, Tris, TES en Hepes bleken de meest effectieve incubatie-buffers te zijn.

Het rapport wordt afgesloten met enige aanbevelingen tot nader onderzoek en een computer programma voor het besturen van de detectieapparatuur (Lumac).

## 1. Inleiding

In onderzoek dat gericht is op het voorspellen van het gevaar van milieuvreemde stoffen speelt de toxiciteitsbepaling een belangrijke rol. Men kan hierbij drie vormen van toxiciteitsonderzoek onderscheiden:

(1) kortdurend onderzoek aan één soort met o.a. sterfte en groeiremming als criteria, (2) langdurend onderzoek aan één soort, waarin voornamelijk sublethale effecten worden bestudeerd en (3) onderzoek aan interacterende soorten en (model)ecosystemen, waarin effecten op hoger integratieniveau worden vastgesteld. In de praktijk prevaleert het eerste type onderzoek vanwege de lage kosten, de eenduidigheid van het toetscriterium en de snelheid waarmee een antwoord verkregen wordt. Een nadeel is dat met name mortaliteit een weinig subtiele parameter is en in de veldsituatie zelden optreedt als direct gevolg van hoge stofconcentraties in het milieu. Om deze reden pleit men in wetenschapskringen voor het bestuderen van sub-lethale parameters op soort- of hoger biologisch integratieniveau. Afgezien van de hieraan gekoppelde hogere kosten en langere tijdsduur, wordt in dergelijk onderzoek de parameterkeuze voornamelijk beperkt door het soort toetsorganisme. Hierdoor bestudeert men in de praktijk maar al te vaak niet de meest gewenste parameters, zoals blijkt uit het gegeven dat in meer dan 50% van de studies de onderzochte sublethale effecten niet op een lager concentratieniveau optreden dan sterfte (Slooff en Canton, 1983; Woltering, 1984).

Stoffen interacteren eerst op moleculair niveau, alvorens aantoonbare schade te veroorzaken op cellulair, organismaal of ecosysteem niveau. Om deze reden verdienen specifieke biochemische parameters nadere aandacht. Naast vermeende hoge gevoeligheid zijn deze parameters wellicht tijd- en daardoor kostenbesparend, behoeven weinig biologisch materiaal en kunnen op ieder soort organisme van toepassing zijn. Om deze redenen biedt het gebruik ervan ook voordeel in veldstudies gericht op het vaststellen van de belasting van ecosystemen en onderdelen daarvan en kan een rol spelen bij het ontwikkelen en controleren van ecologische normdoelstellingen.

Een potentieel geschikte biochemische parameter is de "adenylate energy charge" (AEC).

Met deze term wordt de hoeveelheid energie aangegeven die voor een biologische eenheid beschikbaar is om zich te handhaven, te groeien en zich te vermenigvuldigen. Ofschoon het begrip AEC reeds aan het eind van de 60-er jaren geïntroduceerd werd (Atkinson, 1967), bestaat blijkens het toenemend aantal publikaties in de afgelopen jaren over dit onderwerp pas recentelijk

een wezenlijke belangstelling voor deze parameter (Ivanovici en Wiebe, 1981).

In het kader van de RIVM-projecten 847109 en 842052 zal de bruikbaarheid van AEC als eco(toxico)logische parameter nader geëvalueerd worden, waarvan het resultaat in de vorm van een aantal deelrapporten verwoord zal worden. In dit eerste rapport wordt aandacht besteed aan de achtergrond van AEC en wordt op basis van literatuurgegevens een aanbeveling gedaan betreffende de te volgen bepalingmethode(n). Daarnaast wordt een computer (Apple)-programma gegeven voor het sturen van de detectieapparatuur (Lumac).

## 2. Achtergrond

Alle metabolische omzettingen gaan gepaard met het verbruik of de vorming van het energierijke ATP en zijn derhalve afhankelijk van het adenine nucleotide systeem. In dit systeem zijn de volgende individuele adenine nucleotiden te onderscheiden: AMP, ADP en ATP. Deze stoffen bestaan uit een heterocyclische base (adenine), waaraan een pentose ring (ribose) is gekoppeld met één (adenosine monofosfaat: AMP), twee (adenosine difosfaat: ADP) of drie fosfaatgroepen (adenosine trifosfaat: ATP), waarbij de energetische waarde toeneemt met het aantal fosfaatgroepen.

Indien aangenomen wordt dat het streven gericht is op het handhaven van een biologisch evenwicht is het een logische conclusie dat de anabolische en catabolische processen onderling gereguleerd worden en dat deze regulatie kinetisch gecontroleerd wordt door hetzelfde systeem (Chapman en Atkinson, 1977). Sommige enzymsystemen worden geactiveerd door de individuele concentraties van AMP, ADP en ATP, terwijl andere reageren op de waarde van de ATP/AMP of ATP/ADP ratio. Gezien deze heterogeniteit in respons is het wenselijk te beschikken over één parameter, waarmee alle effecten van de adenine nucleotiden op enzymatische processen worden gerelateerd aan het energie niveau van de cel. Het adenine nucleotide systeem kan, gezien de rol in het opladen, opslaan en afstaan van energie, vergeleken worden met een elektrische accumulator. In analogie met de lading van een batterij wordt de energie lading van het adenylaat systeem als een geschikte parameter beschouwd.

De lading is hierbij proportioneel aan de hoeveelheid fosfaat dat aan het AMP toegevoegd is; door additie van 2 mol fosfaat per mol wordt het systeem volledig opgeladen en bestaat uitsluitend uit ATP ( $\text{AMP} + 2 \text{P}_i \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$ ). Teneinde de waarde van de lading niet variabel te laten zijn tussen 0 en 2 maar tussen 0 en 1 werd door Atkinson (1967) de energie lading gedefinieerd als de helft van het aantal anhydride-gebonden fosfaat groepen per adenine nucleotide. Dit is gelijk aan de mol fraktie ATP plus de helft van de mol fraktie ADP, of, in termen van individuele concentraties:  $\text{AEC} = [\text{ATP} + 0.5 \text{ADP}] / [\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}]$ .

De voordelen van deze parameter zijn:

- a. AEC is a-specifiek en correleert met de algemene fysiologische conditie ("well-being");
- b. AEC speelt een integrale rol in het energiemetabolisme van alle levende organismen en kan derhalve door het gehele biologische spectrum gemeten worden;

- c. AEC heeft onder normale omstandigheden een stabiele waarde die meestal boven 0.75 ligt (Haya en Waiwood, 1983);
- d. de variatie tussen individuen is voor AEC minder dan voor concentraties van de afzonderlijke nucleotiden of andere fysiologische metingen. Dit heeft het voordeel dat een relatief gering aantal individuen nodig is om significante verschillen tussen toetsgroepen aan te tonen.
- e. de reactietijd is snel en varieert van minuten voor eencelligen tot meestal minder dan 24 h voor meercellige organismen. In die gevallen, waarin een respons langer duurt dan 1 dag blijkt deze reactietijd korter te zijn dan die van andere fysiologische veranderingen.

De nadelen van deze parameter zijn:

- a. AEC is aspecifiek en verschaft derhalve geen enkele informatie over de aard van de belasting;
- b. de respons verloopt over het algemeen niet lineair maar vertoont veelal een stapsgewijze functie, waardoor de interpretatie van een verlaging in AEC bemoeilijkt wordt. In globale termen kunnen drie trajecten onderscheiden worden, die echter niet scherp afgegrensd zijn. Waarden hoger dan 0.75 zijn indicatief voor optimale condities; die tussen 0.50-0.75 geven een lichte tot matig belaste toestand aan, terwijl niveau's lager dan 0.50 kenmerkend zijn voor een zwaar belaste toestand (veelal irreversibel) (Haya en Waiwood, 1983);
- c. er zijn uitzonderingsgevallen bekend, waarin zwaarbelaste organismen blijken te beschikken over mechanismen welke variaties in AEC teniet kunnen doen (Ivanovici en Wiebe, 1981).

Deze nadelen leiden tot de conclusie dat het toepassen van AEC in onderzoek alleen dan zinvol is indien (1) men bekend is met de aard van de belasting danwel over betrouwbare referentiewaarden beschikt; (2) tevens andere sublethale parameters mede in het onderzoek betreft en (3) op empirische basis geschikte indicatorsoorten kiest.



### 3. Bepalingsmethoden

In het ideale geval dient het bepalen van de AEC te berusten op het volgen van een procedure welke leidt tot het kwantificeren van de nucleotiden in een verhouding zoals die oorspronkelijk in de te onderzoeken cel(massa) voorkomt. Dit stelt de nodige eisen aan de verschillende stappen die men in deze procedure kan onderscheiden, te weten de bemonstering en eventuele conservering van het biologisch object, en de extractie en uiteindelijke enzymatische bepaling van de individuele nucleotiden. Ter vaststelling van de meest geëigende procedure werd een literatuuronderzoek verricht naar de bruikbaarheid van diverse technieken.

#### 3.1. Bemonstering en conservering

In de literatuur wordt weinig aandacht besteed aan de bemonsteringswijze van de organismen en de fixatiemethode voor het handhaven van de nucleotiden niveaus. Het is echter bekend dat de omzettingstijd van ATP naar ADP en/of AMP zeer snel kan zijn (1 sec) en mede afhankelijk is van de temperatuur. Derhalve kan in het algemeen gesteld worden dat de organismen zo snel en zo min mogelijk verstorend bemonsterd en gedood dienen te worden en vervolgens bewaard dienen te worden bij een zo laag mogelijke temperatuur.

De enige informatie over methoden werd verkregen uit onderzoek van plantaardig materiaal. M.b.t. de monsternamen blijkt dat monsters van algen verkregen door directe injectie in het extractiemiddel (buffer) een hogere ATP-waarde geven dan monsters verkregen door filtratie over een membraanfilter (Bulleid, 1978; Henzel & Healy, 1984). Vergelijkbare resultaten werden verkregen door Larsson en Olsson (1979): extracties van algencellen met PCA in situ leidden tot hogere ATP-waarden dan extracties waarbij de cellen in het extractiemiddel werden gebracht (behandelingsduur 1 sec.). Indien toch filtratie dient te worden toegepast wordt aangeraden de kleinst bruikbare hoeveelheid te bepalen. Zo vonden Jewson en Dokulil (1982) een verlaging van 64 % gemeten aan groeiende cellen indien volumes groter dan noodzakelijk werden gebruikt. Tevens wezen deze auteurs op de verstorende invloed van de aanwezigheid van de in het in het medebemonsterde water opgeloste ATP, ook na gebruik van filters (0.2  $\mu$ m).

Uit het onderzoek van Mendelsohn en McKee (1981) komt naar voren dat direct na bemonstering de methode van invriezen in vloeibare stikstof en binnen 24 uur vriesdrogen de beste is. Monsters ingevroren met vloeibare stikstof geven een hogere ATP, ADP en AMP concentratie dan monsters ingevroren door middel van droogijs; de AEC-waarde is niettemin dezelfde.

Daarnaast werd vastgesteld dat de ATP en ADP waarden verkregen na vriesdrogen in gedeïoniseerd water hoger zijn dan na vriesdrogen in niet gedeïoniseerd water.

### 3.2. Extractie

Voor het verkrijgen van ATP, ADP en AMP zijn met name in de laatste jaren vele extractiemethoden beschreven (Tabel 1). Het aantal vergelijkende studies naar de recovery en betrouwbaarheid van deze methoden is echter beperkt.

Lundin en Thore (1975) vergeleken tien verschillende extractiemethoden voor het bepalen van de AEC van bacteriën: Tris-EDTA, KOH, ethanol, butanol, chloroform, methanol, zwavelzuur, TAEB, TCA en PCA. Ofschoon in eerste instantie de analyse door bacterieel enzymatische werking tijdens de extractie werd verstoord, bleek deze verstoring opgeheven te worden door toevoeging van EDTA aan het extractiemiddel. In het algemeen bleek TCA het extractiemiddel te zijn dat de actuele hoeveelheden ATP, ADP en AMP in intacte bacteriën het meest benaderd. In bepaalde bacteriestammen kunnen andere extractiemiddelen echter even goede resultaten geven (b.v. ethanol, TAEB). Daar TCA-extractie arbeidsintensief is kan derhalve het gebruik van meer specifieke extractiemiddelen praktisch voordeel opleveren.

Larsson en Olsson (1979) vergeleken zes extractiemethoden: Tris, ethanol, chloroform, zwavelzuur, TCA en PCA. Extracties van algen met TCA en PCA gaven in het algemeen een hogere ATP/ADP verhouding en een hogere AEC waarde.

Sklar en McKee (1984) vergeleken EDTA en PCA voor het bepalen van de AEC van vis. Met EDTA werden significant lagere waarden voor ATP, ADP en AMP verkregen. Niettemin bleken de nucleotiden verhoudingen min of meer vergelijkbaar hetgeen resulteerde in vrijwel dezelfde AEC-niveaus.

Mendelssohn en McKee (1981) vergeleken enige extractiemiddelen aan vaatplanten. Kokende EDTA + PVPP resulteerde in hogere AEC-waarden dan kokende EDTA, TCA en PCA, maar deze verschillen waren niet significant.

Karl en Holm-Hansen (1978) vonden hogere ATP en AEC-waarden bij PCA-extractie van marien sediment en meercellige organismen dan bij kokende Tris.

Bulleid (1978) vergeleek Tris-,  $\text{NaHCO}_3$ , Sorensen- en McIlvainebuffer bij de extractie van ATP uit marien sediment en zeewater. Bicarbonaat en fosfaat oefenden een remmende werking uit en de beste resultaten werden verkregen met de McIlvaine buffer.

Tabel I

extractie middel	molair/%	temp. in C	extractie op pH tijd in min.	gebracht met	tot pH	para- meter	soort organisme	referentie
Butanol-EDTA	83%; 17mM	20	3	H2SO4/KOH	7	AEC	bacterien	Lundin & Thore, 1975
CHC13-EDTA	100 mM	100	2		7	AEC	phytoplankton	Larsson & Olssen, 1979
CHC13-EDTA	100 mM	20	2	H2SO4/KOH	7	AEC	bacterien	Lundin & Thore, 1975
EDTA	1 mM	100	0.5		7.4	AEC	planten	Mendelsson & McKee, 1981
EDTA	1 mM	kokend	0.5		6.5	AEC	vis	SKlar & McKee, 1984
EDTA-PVPP	1 mM; 5%	100	0.5		7.4	AEC	planten	Mendelsson & McKee, 1981
Ethanol		kokend	1			ATP	phytoplankton	St.John,1970
Ethanol	80%					AEC	phytoplankton	Pelroy et al, 1976
Ethanol		80	10			AEC	bacterien	Chapman et al, 1971
Ethanol	95%	78	5			AEC	gistcellen	Ball & Atkinson, 1975
Ethanol-EDTA	96%; 100mM	kokend	1		7	AEC	phytoplankton	Larsson & Olssen, 1979
Ethanol-EDTA	96%, 4mM	78	1	H2SO4/KOH	7	AEC	bacterien	Lundin & Thore, 1975
Formalinezuur	80%	-20				AEC	planten	Bomse1 & Pradet, 1968
Fosfaatbuffer	75 mM			KCL (8mM)	7.5	AEC	marie org.	Klinken & Skjoldal, 1983
Glycine	20 mM	kokend	15		7.75	ATP	phytoplankton	Bedell & Govindjee, 1973
Glycine		kokend	5		10	ATP	water, grond	Afghan et al., 1977
Glycine-EDTA		kokend	5			ATP	water, grond	Afghan et al., 1977
Glycine-MgEDTA	10/5 mM	kokend	5		10	ATP	water, grond	Tobin et al., 1978
H2O		kokend	10			ATP	phytoplankton	Strehler,1953
H2O		kokend	10			ATP	phytoplankton	Kylin & Tillberg, 1967
H2O		100	2			AEC	planten	Bomse1 & Pradet, 1968
H2O		60	5			AEC	planten	Pradet, 1967
H2SO4-EDTA	0.6 N.		5	NaOH	7.7	AEC	divers	Karl et al, 1978
H2SO4-EDTA	0.25 M; 17 mM	0	20-20	KOH+TRIS	7.75	AEC	phytoplankton	Larsson & Olssen, 1979
H2SO4-EDTA	0.25 M; 17 mM	0	15	H2SO4/KOH	7.75	AEC	bacterien	Lundin & Thore, 1975
H3PO4	1 M		30		7.8-7.9	AEC	phytoplankton	Fitzwater et al, 1983
HCOOH	2,6 M	0				AEC	bacterien	Andersen & Meyenburg, 1977
HCOOH-EDTA	0.38 M; 17mM	0	15	H2SO4/KOH	7.75	AEC	bacterien	Lundin & Thore, 1975
HCl		0-4				ATP	phytoplankton	Kool, 1976
KOH-Tris-EDTA	10, 10, 2 mM	100	1.5	H2SO4/KOH	7.75	AEC	bacterien	Lundin & Thore, 1975
Na2HPO4	0.065 M	kokend	1	KH2HPO4 (0.065 M)	7.70	ATP	sediment, water	Bulleid, 1978
Na2HPO4	0.04 M	kokend	1	citroenzuur (0.02M)	7.70	ATP	sediment, water	Bulleid, 1978
Na2HPO4	0.04 M	kokend	1	citroenzuur (0.02M)	7.7	AEC	phytoplankton	Jewson, 1982
Na3PO4/CHC13	10 mM		2			ATP	water, grond	Tobin et al., 1978

Vervolg Tabel 1

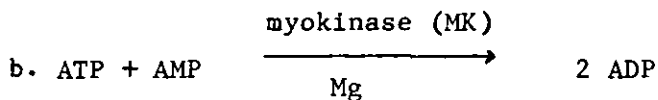
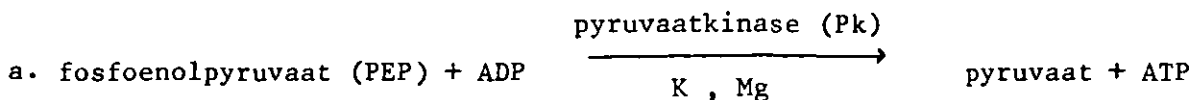
extractie middel	molaire%	temp. in C	extractie tijd in min.	op pH gebracht met	tot pH	para- meter	soort organisme	referentie
NaHCO <sub>3</sub>	0.1 M	kokend	10	NaOH	7.7	AEC	strandzand	Karl et al, 1978
NaHCO <sub>3</sub>	0.1 M	kokend	1	HCL (1N)	8.3	ATP	sediment, water	Bulleid, 1978
NaHCO <sub>3</sub>	0.1 M	kokend	1			AEC	bacterien	Wiebe & Bancroft, 1975
NaHCO <sub>3</sub>	0.1 M	kokend	5	HCl	8.5	AEC	planten	Pamatmat, 1979
NaOH	0.02 N	60	25	EDTA 5 mM	9.8	ATP	milt	Wettermark, 1970
NaOH	0.1 N	60	30			AEC	zoogdieren	Lust et al, 1981
PCA	0.45 M			K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2 M)	7.4	ATP	phytoplankton	Lewenstein & Schneider, 1972
PCA	6%	0	15-20	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (5N)	6.5-7.0	AEC	molusken	Ivanovici, 1979
PCA	6%	-196		K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6.0-6.4	AEC	crustaceen	Giesy et al, 1981
PCA	6%	-196		K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0.1-5N)	7.4	AEC	mossel	Giesy et al, 1983
PCA	6%	-4	30	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	7.4	AEC	vispiëren	Vetter & Hodson, 1982
PCA	6%	0	5	KOH (2.6N)		AEC	planten	Mendelsson & McKee, 1981
PCA	6%	0	30	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (5N)	6.5	AEC	vis	Sklar & McKee, 1984
PCA	6%	0	15-20	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (5N)	6.5-7.0	AEC	mossel	Ivanovici, 1980
PCA	0.6 M					AEC	mossel	Wijsman, 1984
PCA	0.6-0.75 M	0		KOH, Tris, KCl		ATP	algen	Urbach & Kaiser, 1972
PCA	0.6-0.75 M	0		KOH, Tris, KCl		ATP	algen	Gimmler, 1973
PCA	0.6-0.75 M	0		KOH, Tris, KCl		ATP	algen	Bonnefield, 1976
PCA	0.6-0.75 M	0		KOH, Tris, KCl		ATP	algen	Bottomley & Stewart, 1976a
PCA	0.6-0.75 M	0		KOH, Tris, KCl		AEC	algen	Bottomley & Stewart, 1976b
PCA	0.6-1.0 M			EDTA (5 mM)+ HEPES (0.2 M)				
PCA	0.6-1.0 M			K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3M)		AEC	bloedplaatjes	Mills, 1973
PCA	0.7 M	0	30	KOH (2.5M) + EDTA	7.75	AEC	algen	Larsson et al, 1978
PCA	35%	0	15	KOH (2.6N)		AEC	bacterien	Chapman et al, 1971
PCA	35%	0	5	KOH/KPI (2.5/0.2 M)	7.3	AEC	gist	Ball & Atkinson, 1974
PCA	35 %	0	30	triethanolamine HCL (2M)				
PCA	35 %	0	30	KOH/KHCO <sub>3</sub> (2.6/0.58 M)		AEC	bacterien	Swedes, 1975
PCA-EDTA	0.58 M;??	0	30	KOH (2.6N)	7.2-7.4	AEC	phytoplankton	Falkowski, 1977
PCA-EDTA	0.9 N; 2 mM					AEC	vis (bloed, kieuwen)	Leray et al, 1981
PCA-EDTA	1.4 M; 100mM	0	20-30	KOH (2.5M) + EDTA HEPES (0.2 M)	7.75	AEC	phytoplankton	Larsson & Olssen, 1979
PCA-EDTA	2.3 M; 67 mM	0	15	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /KOH	7.75	AEC	bacterien	Lundin & Olsen, 1975
PCA-EDTA	35%; 17 mM	0	30	KOH (2.6N)	7.2-7.4	AEC	diatomeen	Falkowski, 1977

Vervolg Tabel I

extractie middel	molair%	temp. in C	extractie op pH tijd in min.	gebracht met	tot pH	para- meter	soort organisme	referentie
TCA						AEC	planten	Pamatmat, 1979
TCA	5%	4				AEC	planten	Pradet, 1967
TCA	5%	-15	4x.25			AEC	planten	Bonsel & Pradet, 1968
TCA	0.31 M (5%)	0	15	KOH		ATP	algen	Jeanjean, 1976
TCA	7%	0	5			AEC	mossel	Wijsman, 1976
TCA	10%	0	5	KOH (2.6N)		AEC	planten	Mendeisson & McKee, 1981
TCA-EDTA	0.25 M; 9.3 mM	0	20-30			AEC	zooplankton	SKjoldal, 1981
TCA-EDTA	0.5 M; 17 mM	0	10-15			AEC	mossel	SKjoldal & Barkati, 1982
TCA-EDTA	0.51 M; 17mM	0	15		7.75	AEC	bacterien	Lundin & Olsen, 1975
TCA-EDTA	0.51 M; 100 mM	0	20-30			AEC	phytoplankton	Larsson & Olssen, 1979
TCA-Na2HPO4-Paraquat	0.5 M; 0.25 M; 0.1 M	0	5	NaOH	7.4	AEC	grond	Brookes et al, 1983
Tricine	0.025 mM				7.6	ATP		Webster et al, 1980
Tris		kokend				ATP	phytoplankton	Kool, 1976
Tris	20 mM	kokend	5		7.75	ATP	phytoplankton	Holm-Hansen, 1970
Tris	20 mM	kokend	5		7.7	AEC	divers	Karl et al, 1978
Tris	20 mM	96			7.7	AEC	isopoden	SKjoldal & Bakke, 1977
Tris	20 mM	96			7.7	AEC	isopoden	SKjoldal & bakke, 1978
Tris	20 mM	96			7.7	AEC	isopoden	Bakke & SKjoldal, 1979
Tris	20 mM	kokend			7.7	AEC	algen	Riemann & Wium-Andersen, 1981
Tris	20 mM	kokend	1		7.7	AEC	phytoplankton	Riemann & Wium-Andersen, 1982
Tris	20 mM	kokend	1	HCL (1N)	7.7	ATP	sediment, water	Bulleid, 1978
Tris	20 mM	kokend	4		7.7	AEC	algen	Jewson & Dokulil, 1982
Tris	50 mM	95		HCL	7.4	AEC	copepoden	Banstedt & SKjoldal, 1976
Tris	50 mM	95		HCL	7.4	AEC	zooplankton	SKjoldal & Banstedt, 1976
Tris	50 mM	95	5-8		7.4	AEC	zooplankton	SKjoldal & Banstedt, 1977
Tris	50 mM	kokend	5		7.7	ATP	algen	Hendzel & Healy, 1984
Tris	0.1 M			acetaat	7.75	ATP		Nichols et al, 1981
Tris	0.1 M	kokend		HCl	8.0	AEC	mossel	Wijsman, 1976
Tris- EDTA	20 mM; 2 mM	kokend	2	CH3COOH	7.75	AEC	phytoplankton	Larsson & Olssen, 1979
Tris- EDTA	20 mM; 2 mM	100	1.5	H2SO4/KOH	7.75	AEC	bacterien	Lundin & Thore, 1975
Tris- EDTA	50 uM; 2mM				7.7	ATP	phytoplankton	Pridmore et al, 1984
Tris-Arsenaat- EDTA- n-Butanol	100 mM; 10 mM; 10 mM; 6%	100	1.5	H2SO4/KOH	7.4	AEC	bacterien	Lundin & Thore, 1975

### 3.3. Enzymatische bepaling

Met de enzymatische bepaling kan alleen de concentratie van het ATP van een monster worden bepaald. Het luciferase kataliseert de ATP afhankelijke oxidatie van het D-luciferine (LH2). Eerst wordt een luciferase: luciferyl adenylaat (LH2: AMP) complex gevormd, dat onder invloed van O<sub>2</sub> het oxyluciferine, CO<sub>2</sub>, AMP en licht produceert. Wil men ook de concentraties van ADP en AMP van een monster weten, dan dienen zij met de onderstaande reacties omgezet te worden tot ATP.



Voor de bepaling wordt het vuurvlieg luciferase en luciferine gebruikt. Luciferase en luciferine van verschillende bioluminiserende organismen kunnen echter sterk verschillen (Kricka & Thorpe, 1983). Bij de bepaling wordt tevens gebruik gemaakt van een incubatiebuffer. Net als bij het extractiemiddel is hier een breed scala van buffers toegepast (Tabel II). Ook hier zijn slechts enkele vergelijkende onderzoeken naar de versturende werking op de enzymatische reactie en de betrouwbaarheid gedaan:

Afghan et al. (1977) vergeleken in een onderzoek naar de AEC van grond en water tien verschillende buffers: Tris, MOPS, arsenaat, fosfaat, glycyglycine, s-collidine, HEPES, TES, Tris maleaat en glycine. MOPS, Tris, TES en HEPES buffers gaven de beste resultaten.

Alkalische buffers (pH 10 en hoger) voorkomen hydrolyse van ATP en bleken het meest effectief. Zo bleven ATP-standaarden in 0.01 M glycine (pH 10) gedurende tenminste zes maanden stabiel. Vastgesteld werd dat metalen de relatieve luminicentie kunnen remmen; deze remming kan worden voorkomen door toevoeging van 0.01 M Mg/EDTA aan de glycine. Nicols et al., (1981) onderzochten de effecten van verschillende anionen in een buffer. Onderzocht werden acetaat, chloride, sulfaat, fosfaat, formaat, nitraat, malaat, citraat, succinaat, tartraat, oxalaat, propionaat en butyraat. Ofschoon alle anionen een remmende werking uitoefenen op het vuurvlieg luciferase, bleken acetaat en succinaat het minst remmend te werken waarbij het gebruik van acetaat wordt aanbevolen.

Tabel 11

buffer	+ toevoegingen	verwijzing
Arsenaat		Afghan et al., 1977
fosfaat	MgSO <sub>4</sub>	Vetter & Hodson, 1982
fosfaat		Afghan et al., 1977
glycine		Afghan et al., 1977
glycylglycine		Afghan et al., 1977
glycylglycine	DTT; EGTA; MgCl <sub>2</sub> ; BSA; P1,P5-di(adenosine-5')- pentafosfaat	Lust et al., 1981
glycylglycine	MgCl <sub>2</sub>	Chapman et al., 1971
glycylglycine	MgCl <sub>2</sub>	Pamatmat et al., 1979
glycylglycine	MgCl <sub>2</sub>	Skjoldal & Bakke, 1977
glycylglycine	MgCl <sub>2</sub>	Wiebe & Bancroft, 1971
glycylglycine	MgCl <sub>2</sub>	Skjoldal & Bakke, 1978
glycylglycine	MgCl <sub>2</sub>	Suedes et al., 1975
glycylglycine	MgCl <sub>2</sub>	Falkowski, 1977
glycylglycine		Giesy et al., 1983
HEPES	KCl	methode Lumac
HEPES		Afghan et al., 1977
HEPES	Mg-acetaat; H <sub>2</sub> O	Mendelshon & McKee, 1981
HEPES	Mg-acetaat; H <sub>2</sub> O	Sklar & McKee, 1984
imidazole-HCl	MgCl <sub>2</sub> ; KCl	Lust et al., 1981
Kalium-fosfaat	MgCl <sub>2</sub>	Klinken & Skjoldal, 1983
Kalium-fosfaat	MgCl <sub>2</sub> ; KCl	Klinken & Skjoldal, 1983
Kalium-fosfaat	MgSO <sub>4</sub>	Ball & Atkinson, 1975
Kalium-fosfaat	MgCl <sub>2</sub>	Skjoldal & Bamstedt, 1977
Kalium-fosfaat	MgCl <sub>2</sub>	Bakke & Skjoldal, 1979
Kalium-fosfaat	MgCl <sub>2</sub>	Chapman et al., 1971
Kalium-fosfaat	MgCl <sub>2</sub>	Pamatmat et al., 1979
MOPS		Afghan et al., 1977
Kaliumfosfaat	MgCl <sub>2</sub>	Karl & Holm-Hansen, 1978
natriumfosfaat	MgCl <sub>2</sub>	Riemann & Wium-Andersen, 1981
natriumfosfaat	MgCl <sub>2</sub>	Fitzwater et al., 1983
natriumfosfaat	MgCl <sub>2</sub>	Jewson & Dokulil, 1982
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -HCl	MgCl <sub>2</sub> ; arsenaatbuffer	Brookes et al., 1983
TES		Afghan et al., 1977
tricine	MgSO <sub>4</sub> ; EDTA; DTT	Webster et al., 1980
triethanolamine-HCl	KCl; MgCl <sub>2</sub> ; EDTA; BSA; DTT; D-[U- <sup>14</sup> C]glucose	Goswami & Pande, 1984
triethanolamino	MgCl <sub>2</sub> ; DTT; NADH; 3P-glyceraat	Kimmich et al., 1975
Tris	Mg; K	Karl & Holm-Hansen, 1978
Tris	MgCl <sub>2</sub> ; KCl	Skjoldal & Barkati, 1981
Tris	acetaat	Nichols et al., 1981
Tris	MgCl <sub>2</sub> ; kaliumfosfaatbuffer	Skjoldal, 1981
Tris	MgCl <sub>2</sub> ; KCl	Wettermark et al., 1970
Tris-EDTA	MgSO <sub>4</sub> ; K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Larsson & Olssen, 1979
Tris-EDTA	MgSO <sub>4</sub> ; K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Lundin & Thore, 1975
Tris-HCl	KCl; MgCl <sub>2</sub>	Kimmich et al., 1975
Tris-maleaat		Afghan et al., 1977
s-collidine		Afghan et al., 1977

Webster et al. (1980) vonden dat Tris, tricine en glycyglycine buffers een significant hogere lichtproductie tot gevolg hadden dan HEPES of fosfaatbuffers en adviseerden op grond van hun bevindingen het gebruik van tricine.

De bepaling met behulp van het vuurvlieg luciferase dient zo spoedig mogelijk na de extractie plaats te vinden. Afghan et al. (1977) melden dat ontdooide oplossingen, zelfs in een ijsbad, hun ATP verloren met een snelheid van 1 à 2% per minuut.

Wijsman (1976) vond dat ATP concentraties verkegen na homogenisatie met behulp van TCA onafhankelijk zijn van de tijd tussen de homogenisatie en de enzymatische bepaling, dit in tegenstelling tot PCA (zie figuur 1). Kokende Tris geeft eveneens een stabiel extract.

#### 4. Aanbevelingen

Ofschoon door vele onderzoekers de AEC in diverse matrices gemeten is kan op grond van onderhavig literatuuronderzoek geconcludeerd worden dat er nog onvoldoende kennis bestaat voor het doen van een aanbeveling m.b.t. de te volgen bepalingsmethoden. Hiertoe is verder fundamenteel onderzoek noodzakelijk. De volgende aanbevelingen voor dergelijk onderzoek zijn:

##### a. M.b.t. de monstername

- het bepalen van het aantal organismen dat nodig is om statistisch verantwoord te werken;
- het bepalen van de invloed van de wijze en snelheid van manipulatie van de organismen voordat fixatie plaats vindt;
- het bepalen van de invloed van leeftijd cq. stadium van de organismen;
- het bepalen van de invloed van schommelingen in temperatuur, licht en zuurstofgehalte;
- het bepalen van de invloed van de stroomsnelheid van het water;
- het bepalen van de invloed van het verversen van het medium;
- het bepalen van de invloed van populatiedruk en voedselstress.

Bedoelde onderzoekingen zijn fundamenteel voor verdere laboratorium- en veldstudies aan AEC en dienen soortspecifiek gericht te zijn.

##### b. M.b.t. conservatie en extractie

- het bestuderen van de mogelijkheid om de organismen met het extractiemiddel in te vriezen;
- het vaststellen van het meest effectieve extractiemethode (Tris, TCA, PCA (zie bijlage A));



- het vaststellen van de meest effectieve behandelingsmethode (sonificeren, vriesdrogen, vermalen);
- het bepalen van het mogelijke verschil in resultaat na directe opwerking en na een zekere periode van opslag.

Deze studies dienen gekoppeld te verlopen en eveneens soortspecifiek gericht te zijn.

c. M.b.t. enzymatische bepaling

- het vaststellen van de nauwkeurigheid waarmee de nucleotiden bepaald kunnen worden en het bepalen van het mogelijk verstorend effect van ATP en ADP bij het kwantificeren van AMP en ADP.
- het vaststellen van de meest effectieve incubatie-buffer (Tricine, MOPS, Tris, TES en HEPES (tabel II)).

## 5. Referenties

Afghan B.K., Tobin R.S. and Ryan J.F. (1977)

Improved method for quantitative measurement of ATP and its application to measure microbial activity in natural waters, activated sludges and sediments.

Symposium Proceeding

Andersen K.B. and Meyenburg K.von (1977)

Charges of nicotinamide adenine nucleotides and adenylate energy charge as regulatory parameters of the metabolism in *Escherichia coli*.

The Journal of Biological Chemistry, 252, (12), 4151-4156.

Atkinson D.E. and Walton G.M. (1967)

Adenosine/triphosphate conservation in melabolic regulation.

Journal of Biological Chemistry, 242, 3239-3241.

Atkinson D.E. (1969)

Regulation of enzyme function

Annu.Rev.Microbiol. 23, 47-68.

Bakke T. and Skjoldal H.R. (1979)

Effects of toluene on the survival, respiration, and adenylate system of a marine isopod.

Marine Pollution Bulletin, 10, 111-115.

Ball W.J.jr. and Atkinson D.E. (1975)

Adenylate energy charge in *Saccharomyces cerevisiae* during starvation.

Journal of Bacteriology, 121, (3), 975-982.

Båmstedt U. and Skjoldal H.R. (1976)

Studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, Western Norway. Adenosine phosphates and nucleic acids in *Euchaeta norvegica* (Copepoda) in relation to its life cycle.

Sarsia, 60, 63-80.

Bedell G.W. and Govindjee (1973)

Photophosphorylation in intact algae: Effects of inhibitors, intensity of light, electron acceptor and donors.

Plant & cell Physiol., 14, 1081-1097.

Bomsel J.-L. and Pradét A. (1968)

Study of adenosine 5'-mono-, di- and triphosphates in plant tissues.

IV. Regulation of the level of nucleotides, in vivo, by adenylate kinase: theoretical and experimental study.

Biochimica et Biophysica Acta, 162, 230-242.

Bornefield T. (1976)

The rates of photophosphorylation of the blue-green alga *Anacystis nidulans* at transition from dark to light I.

Rates under conditions of cyclic, pseudo-cyclic and non-cyclic electron flow and in the presence and absence of DCMU [3(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] and desaspidin.

Bioch. Physiol. Pflauzen, 170, 333-344.

Bottomley P.J. and Stewart W.D.P. (1976)

The measurement and significance of ATP pools in filamentous blue-green algae.

Br. Phycol. J., 11, 69-82.

Bottomley P.J. and Stewart W.D.P. (1976)

ATP pools and transients in the blue-green alga *Anabena cylindrica*.

Arch. Microbiol., 108, 249-258.

Brookes P.C., Tate K.R. and Jenkinson D.S. (1983)

The adenylate energy charge of the soil microbial biomass.

Soil Biol. Biochem., 15, (1), 9-16.

Bulleid N.C. (1978)

An improved method for the extraction of adenosine triphosphate from marine sediment and seawater.

Limnology and Oceanography, 23, 174-178.

Chapman A.G. and Atkinson D.E. (1977)

Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast.

Advances in microbial physiology (A.H.Rose and D.W.Tempest, eds.), 15, 253-306. Academic Press, London and New York.

Chapman A.G., Fall L. and Atkinson D.E. (1971)

Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *Journal of Bacteriology*, 1072-1086.

Deluca M.A. (1976)

Advances in Enzymology (Meister, A., ed.)  
Wiley, New York, 44, 37-68.

Falkowski P.G. (1977)

The adenylate energy charge in marine phytoplankton: the effect of temperature on the physiological state of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve.

*J.Exp.Mar.Biol.Ecol*, 27, 37-45.

Fitzwater S.E., Knauer G.A. and Martin J.H. (1983)

The effects of Cu on the adenylate energy charge of open ocean phytoplankton.

*Journal of Plankton Research*, 5, (6), 935-938.

Giesy J.P., Denzer S.R., Duke C.S. and Dickson G.W. (1981)

Phosphoadenylate concentrations and energy charge in two freshwater crustaceans: Responses to physical and chemical stressors.

*Verh.Internat.Verein.limnol.*, 21, 205-220.

Giesy J.P., Duke C.S., Bingham R.D. and Dickson G.W. (1983)

Changes in phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge as an integrated biochemical measure of stress in invertebrates: the effects of cadmium on the freshwater clam *Carbicula fluminea*.

*Toxicological and Environmental Chemistry*, 6, 259-295.

Gimmler H. (1973)

Correlations between photophosphorylation and light-induced conformational changes of chloroplasts in whole cells of the halophilic green alga *Dunaliella parva*.

*Z.Pflanzenphysiol.*, 68, 289-307.

Goswami T. and Pande S.V. (1984)

Radioisotopic assay of femtomole quantities of total adenine nucleotides, ATP plus ADP and AMP.

Journal of biochemical and biophysical methods, 9, 143-151.

Haya K. and Waiwood B.A. (1983)

Adenylate energy charge and ATPase activity: potential biochemical indicators of sublethal effects caused by pollutants in aquatic animals.

Aquatic Toxicology, chapter 10, edited by J.O.Nriagu, John Wiley and Sons Inc., 307-333.

Hendzel L.L. and Healey F.P. (1984)

Extraction of algal ATP and interpretation of measurements.

Can.J.Fish.Aquat.Sci., 41, 1601-1608.

Holm-Hansen O. (1970)

ATP levels in algal cells as influenced by environmental conditions.

Plant and cell Physiol., 11, 689-700.

Holm-Hansen O. and Booth C.R. (1966)

The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance.

Limnol.Oceanogr. 11, 510-519.

Ivanovici A.M. (1979)

Adenylate energy charge: potential value as a tool for rapid determination of toxicity effects.

Fish.Mar.Serv.Tech.Rep., 862, 241-255.

Ivanovici A.M. (1980)

Adenylate energy charge: an evaluation of applicability to assessment of pollution effects and directions for future research.

Rapp.P.-v.Réun.Cons.int.Explor.Mer, 179, 23-28.

Ivanovici A.M. and Wiebe W.J. (1981)

Towards a working "definition" of "stress": A review and critique.

Stress effects on natural ecosystems chapter 2, edited by G.W. Barrett and R. Rosenberg, John Wiley and Sons Ltd.

Jeanjean R. (1976)

The effect of metabolic poisons on ATP level and on phosphate uptake in *Chlorella pyrenoidosa*.

Physiol.Plant., 37, 107-110.

Jewson D.H. and Dokulil M. (1982)

Adenylate energy charge measurements in freshwater microbial studies.

Journal of Ecology, 70, 595-606.

Karl D.M., Haugsness J.A., Campbell L. and Holm-Hansen O. (1978)

Adenine nucleotide extraction from multicellular organisms and beach sand: ATP recovery, energy charge ratios and determination of carbon/ATP ratios.

J.exp.mar.Biol.Ecol., 34, 163-181.

Karl D.M. and Holm-Hansen O. (1978)

Adenylate energy charge measurements in natural seawater and sediment samples.

141-169.

Karl D.M. and Holm-Hansen O. (1978)

Methodology and measurement of adenylate energy charge ratios in environmental samples.

Marine Biology, 48, 185-197.

Kimmich G.A., Randles J. and Brand J.S. (1975)

Assay of picomole amounts of ATP, ADP, and AMP using the luciferase enzyme system.

Analytical Biochemistry, 69, 187-206.

Klinken J. and Skjoldal H.R. (1983)

Improvements of luciferin-luciferase methodology for determination of adenylate energy charge ratio of marine samples.

Marine ecology - progress series, 13, 305-309.

Kool H.J. (1976)

The use of adenosine triphosphate (ATP) as an indicator of biological activity and biomass in ecological studies.

Hydrobiological Bulletin, 10, (3), 145-154.

Kricka L.J. and Thorpe G.H.G. (1983)

Chemiluminescent and bioluminescent methods in analytical chemistry.  
Analyst, 108, 1274-1296.

Kylin A. and Tillberg J.E. (1967)

Action sites of the inhibitor - complex from potato and of phloridzin in  
light-induced energy transfer in *Scenedesmus*.  
Z.Pflanzenphysiol., 57, 72-78.

Larsson C.-M. and Olsson T. (1979)

Firefly assay of adenine nucleotides from algae: comparison of extraction  
methods.  
Plant and cell Physiol., 20, (1), 145-155.

Larsson C.-M., Tillberg J.-E. and Hallmén G. (1978)

Light-induced phosphate binding in relation to photophosphorylation and  
levels of ATP, ADP and AMP in the green alga *Scenedesmus*.  
Physiol.Plant, 44, 115-121.

Leray C., Colin D.A. and Florentz A. (1981)

Time course of osmotic adaptation and gill energetics of rainbow trout (*Salmo  
gairdneri* R.) following abrupt changes in external salinity.  
J.Comp.Physiol., 144, 175-181.

Lewenstein A. and Schneider K. (1972)

The level of ATP in *Chlorella*.  
Proceedings of the 2nd Int.Cong.on Photosynthesis.  
Edited by G.Forti, M.Avron and A.Melandri  
Dr.W.Junk N.V. Publishers, The Hague, 1371-1378.

Lundin A. and Thore A. (1975a)

Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides  
determined by firefly assay.  
Applied Microbiology, 30, (5), 713-721.

Lundin A. and Thore A. (1975b)

Analytical information obtainable by evaluation of the time-course of  
firefly bioluminescence in the assay of ATP.  
Anal. Biochemistry, 66, 47-63.

- Lust W.D., Feussner G.K., Barbehenn E.K. and Passonneau J.V. (1981)  
The enzymatic measurement of adenine nucleotides and P-creatine in picomole amounts.  
Analytical Biochemistry, 110, 258-266.
- Mendelssohn I.A. and McKee K.L. (1981)  
Determination of adenine nucleotide levels and adenylate energy charge ratio in two *Spartina* species.  
Aquatic Botany, 11, 37-55.
- Mills D.C.B. (1973)  
Changes in the adenylate energy charge in human blood platelets induced by adenine diphosphate.  
Nature, 243, (128), 220-222.
- Nichols W.W., Curtis G.D.W. and Johnston H.H. (1981)  
Choice of buffer anion for the assay of adenosine 5'-triphosphate using firefly luciferase.  
Analytical Biochemistry, 114, 396-397.
- Pamatmat M.M. and Skjoldal H.R. (1979)  
Metabolic activity, adenosine phosphates and energy charge of below ground biomass of *Juncus roemerianus* Scheele and *Spartina alterniflora* Loisel.  
Estuarine and Coastal Marine Science, 9, 79-90.
- Pelroy R.A., Kirk M.R. and Bassham J.A. (1976)  
*Photosystem II regulation of macromolecule synthesis in the blue-green alga Aphanocapsa 6714.*  
J.Bacteriol. 128, 623-632.
- Pradêt A. (1967)  
Etude des adénosine-5'-mono, di- et tri-phosphates dans les tissus végétaux.  
1. Dosage enzymatique.  
Physiol.Vég., 5, (3), 209-221.
- Pridmore R.D., Cooper A.B. and Hewith J.E. (1984)  
ATP as a biomass indicator in eight North Island Lakes, New Zealand.  
Freshwater Biology, 14, 73-78.



Riemann B. and Wiium-Andersen S. (1981)

The ATP and total adenine nucleotide content of four unicellular and colonial green algae.

OIKOS, 36, 368-373.

Riemann B. and Wiium-Andersen S. (1982)

Predictive value of adenylate energy charge for metabolic and growth states of planktonic communities in lakes.

OIKOS, 39, 256-260.

Ritter K., Fischer S. and Dancker P. (1984)

Spectrometric methods. Bioluminescence as a tool of measuring ATP turnover during actin polymerization and during its interaction with cytochalasin B.

Fresenius Z.Anal.Chem., 317, 695-696.

Skjoldal H.R (1981)

ATP concentration and adenylate energy charge of tropical zooplankton from waters inside the great barrier reef.

Marine Biology, 62, 119-123.

Skjoldal H.R. and Baakke T. (1977)

Anaerobic metabolism of the scavenging isopod *Cirolana borealis* Lilljeborg. Adenine nucleotides.

Physiology and behavior of marine organisms, 67-74.

Skjoldal H.R. and Bakke T. (1978)

Relationship between ATP and energy charge during lethal metabolic stress of the marine isopod *Cirolana borealis*.

The Journal of Biological Chemistry, 253, (10), 3355-3356.

Skjoldal H.R. and Båmstedt (1976)

Studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, Western Norway.

Adenosine phosphates and nucleic acids in *Meganyctiphanes norvegica* (Euphausiacea) in relation to the life cycle.

SARSIA, 61, 1-14.

Skjoldal H.R. and Båmstedt U. (1977)

Ecobiochemical studies on the deep-water pelagic community of Korsfjorden, Western Norway. Adenine nucleotides in zooplankton.

Marine Biology, 42, 197-211.

Skjoldal H.R. and Barkati S. (1982)

ATP content and adenylate energy charge of the mussel *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle in Lindåspollene, Western Norway.  
*Marine Biology*, 70, 1-6.

Sklar F.H. and McKee K.L. (1984)

Adenylate energy charge (AEC) response to stress and extraction technique in the Louisiana Swamp crayfish, *Procambarus clarkii*.  
*Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 33, 584-591.

Slooff W. and Canton J.H. (1983)

Comparison of the susceptibility of 11 freshwater species to 8 chemical compounds II. (semi)chronic tests.  
*Aquat. Toxicol.*, 4, 113-128.

St. John J.B. (1970)

Determination of ATP in *Chlorella* with the luciferine-luciferase system.  
*Anal. Bioch.*, 37, 409-416.

Strehler B.L. (1953)

Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms.  
II. Adenosine triphosphate and photosynthesis.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 43, 67-79.

Swedes J.S., Sedo R.J. and Atkinson D.E. (1975)

Relation of growth and protein synthesis to the adenylate energy charge in an adenine-requiring mutant of *Escherichia coli*.  
*J. Biol. Chem.*, 250, (17), 6930-6938.

Tobin R.S., Ryan J.F. and Afghan B.K. (1978)

An improved method for the determination of adenosinetriphosphate in environmental samples.  
*Water Research*.

Urbach W. and Kaiser W. (1972)

Changes of ATP levels in green algae and intact chloroplasts by different photosynthetic reactions.  
*Proceedings of the 2nd Int. Cong. on Photosynthesis*. Edited by G. Forti, M. Avron and A. Melandri. Dr. W. Junk N.V. Publishers, The Hague, 1401-1411.

Vetter R.D. and Hodson R.E. (1982)

Use of adenylate concentrations and adenylate energy charge as indicators of hypoxic stress in estuarine fish.

Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 39, (4), 535-541.

Webster J.J., Chang J.C., Manley E.R., Spivey H.O. and Leach F.R. (1980)

Buffer effects on ATP analysis by firefly luciferase.

Analytical Biochemistry, 106, 7-11.

Wettermark G., Tegnér L., Brolin S.E. and Borglund E. (1970)

Photokinetic measurements of the ATP and ADP levels in isolated Islets of Langerhans.

In the "Structure and metabolism of the pancreatic islets".

S.Falkner, B.Hellman and I.B.Täljedal, eds. Wenner-Gren Symp., 16, 275-282.

Wiebe W.J. and Bancroft K. (1975)

Use of the adenylate energy charge ratio to measure growth state of natural microbial communities.

Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 72, (6), 2112-2115.

Woltering D.M. (1984)

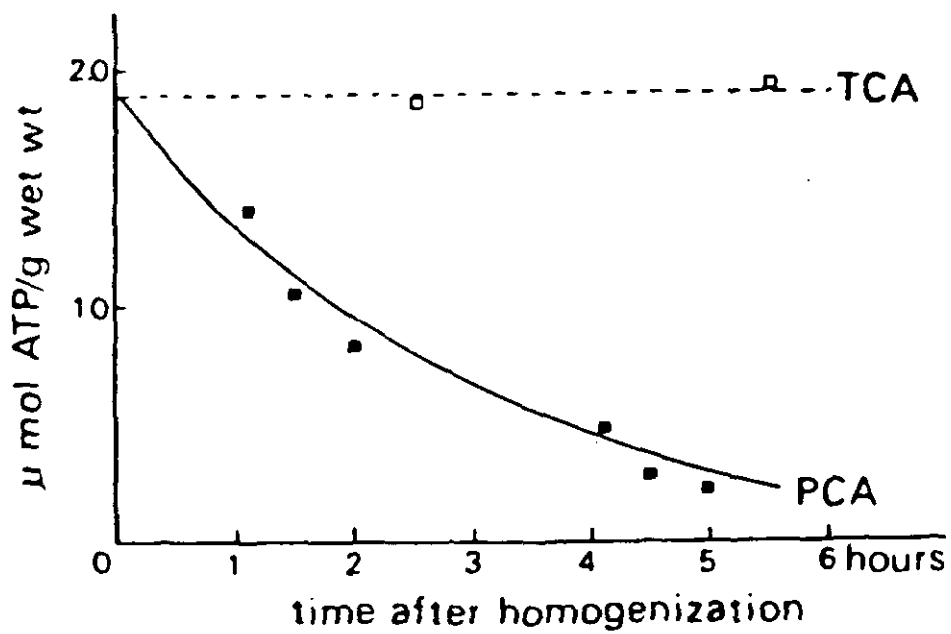
The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests: a critical review.

Aquat.Toxic., 5, 1-21.

Wijsman T.C.M. (1976)

Adenosine phosphates and energy charge in different tissues of *Mytilus edulis* L. under aerobic and anaerobic conditions.

J.Comp.Physiol., 17, 129-140.



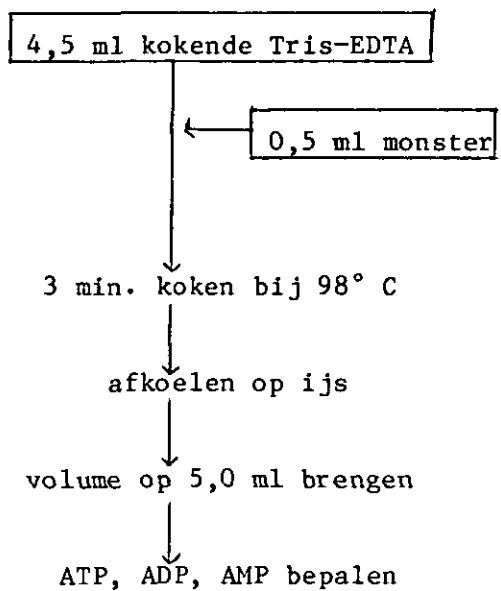
Figuur 1. ATP-waarden als een functie van de tijd tussen homogenisatie met PCA of TCA en de enzymatische bepaling (Wijsman, 1976)

Lijst van gebruikte afkortingen en verklaring van enige namen

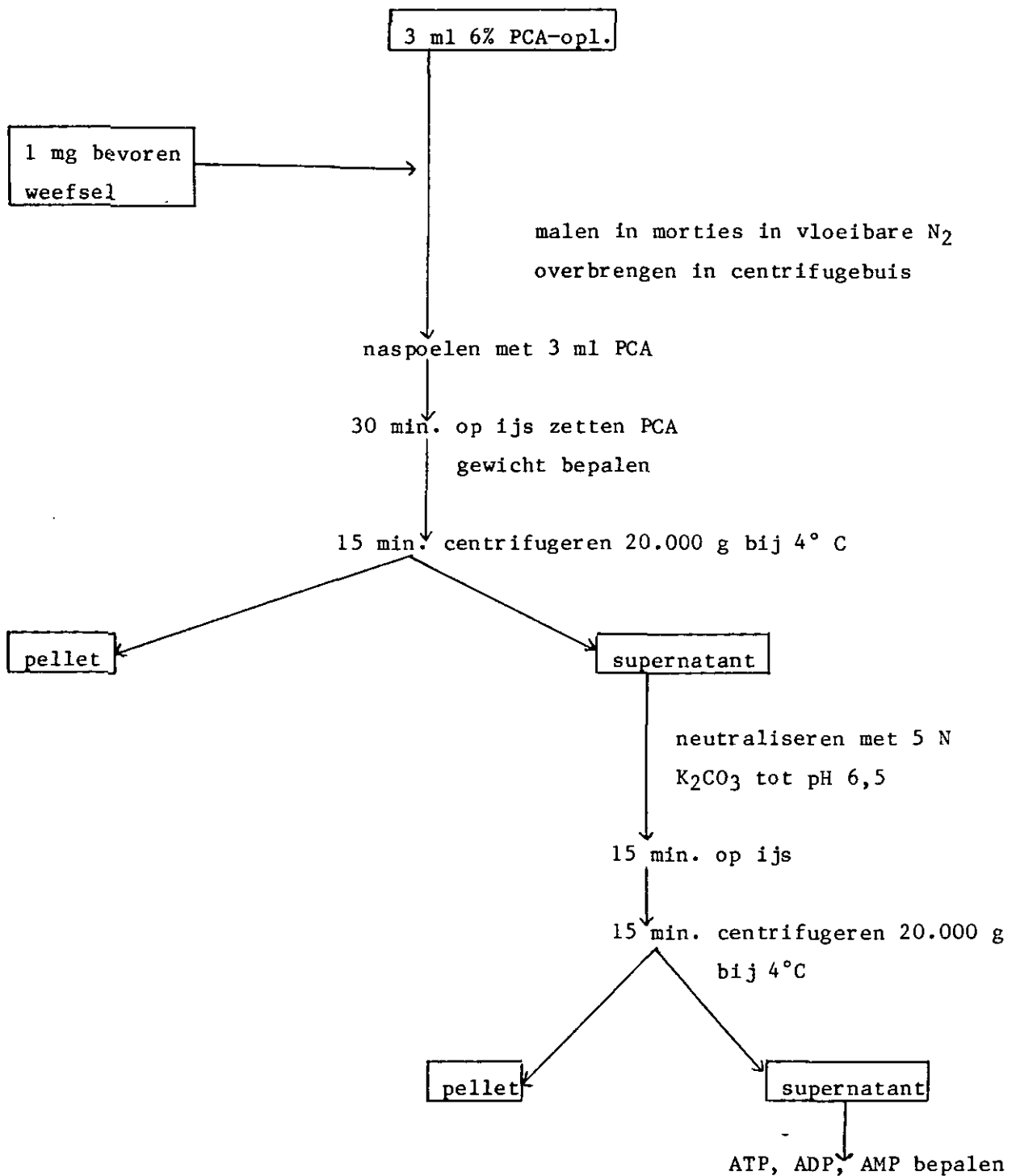
BSA	bovine serum albumin
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene bis-(oxyethylenenitrolo)tetraacetic acid
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid
MOPS	3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid
NADH	1,4-dihydro-nicotinamide adenine dinucleotide
PCA	perchloric acid
PVPP	polyvinylpolypyrrolidone
TAEB	tris-EDTA-arsenate-n-butanol
TCA	trichloroacetic acid
TES	N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-amino-ethanesulfonate
Tricine	N-tris(hydroxymethyl)methylglycine
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

Bijlage A: de drie extractiemethoden (Tris, PCA en TCA)

Lumac-methode: Tris-extractie

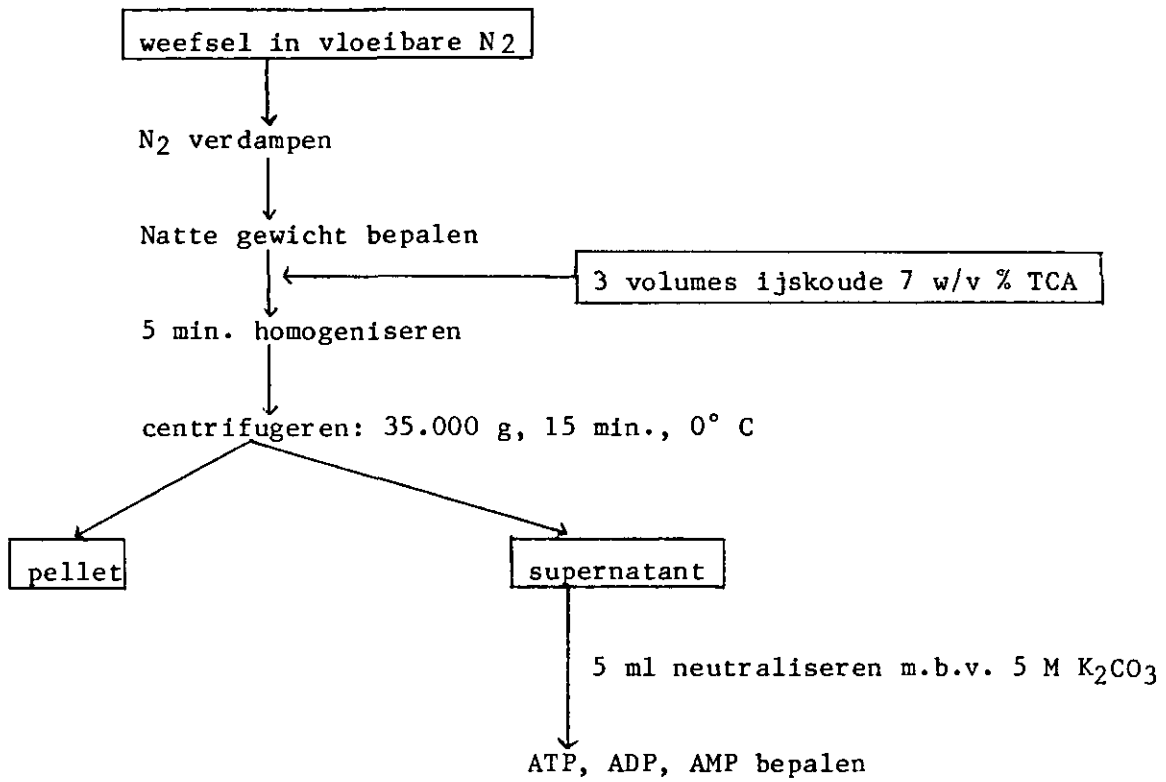


Sklar, McKee (1984) : PCA-extractie

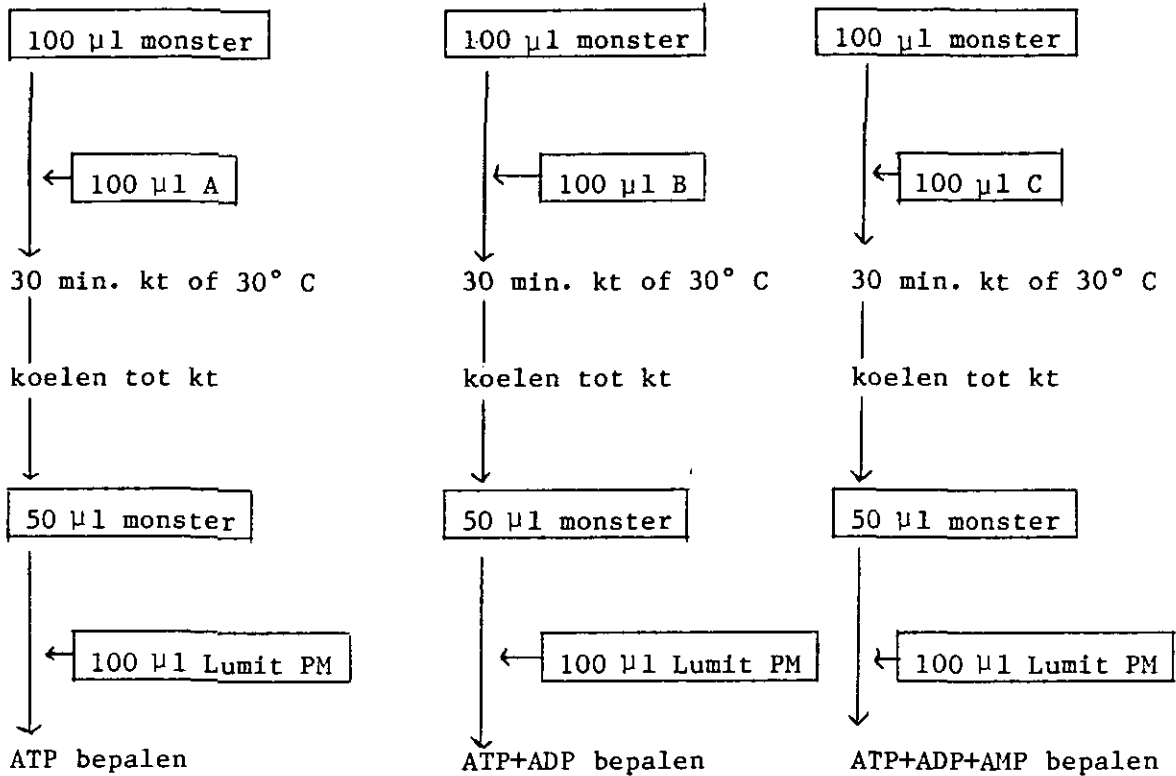




Wijsman, 1976 : TCA-extractie



Bepaling ATP, ADP, AMP volgens Lumac-methode



A = 25 mM Hepes -10 mM KCl, pH 7,75

B = phosphoenolpyruvate en pyruvatekinase in Hepes - KCl pH 7,75

C = myokinase enzym in 3,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> in reagens B

Lumit PM = luciferine - luciferase in 25 mM Hepes pH 7,75

kt = kamertemperatuur

Bijlage B: Computerprogramma voor de besturing van de detectie apparatuur  
(Lumac)

LIST

```
1 REM GOTO 1080
100 GOTO 980
110 REM GEBRUIKTE SUBROUTINES
120 REM PRINTLINE$ PRINTEN OP HP,VP
130 VTAB (VP%); HTAB (HP%); PRINT PRINTLINE$;
140 RETURN
150 REM SCHONMAKEN EN OPZETTEN BEELDSCHERM
160 TEXT
170 L1$ = "-----"
180 L2$ = " "
190 L3$ = " "
200 HOME
210 VP% = 1:HP% = 1:PRINTLINE$ = L1$: INVERSE : GOSUB 130
220 VP% = 2:HP% = 1:PRINTLINE$ = L2$: GOSUB 130:VP% = 23:PRINTLINE$ = L3$: GOSUB 130:VP% = 24: GOSUB 130: NORMAL
230 RETURN
240 REM UITLEZEN DISPLAY BIOCOUNTER
260 D = PEEK (49313)
270 H = D
280 D = ( INT (D / 2)) * 2
290 IF H = D THEN 260
300 E = 16:G = 0
310 FOR T = 1 TO 6
320 E = E + 16
330 POKE 49313,E
340 F = PEEK (49313)
350 FOR I = 1 TO 3
360 IF F < 2 * (7 - I) THEN 380
370 F = F - 2 * (7 - I)
380 NEXT I
390 G = G * 10 + F
400 NEXT T
410 RETURN
420 REM GEGEVENS NAAR ARRAY
430 LET METINGNR% = METINGNR% + 1
440 LET A(METINGNR%) = AP: REM POMPNR
450 LET M(METINGNR%,1) = G%: REM MODE
460 LET C(METINGNR%) = G: REM AANTAL COUNTS
470 RETURN
480 REM INITIALISEREN POMPNR
490 C = AP * 4 + 1
500 POKE 49315,255
510 POKE 49313,C
520 POKE 49324,0
530 RETURN
540 REM POMP AANSTUREN BIJ METING
550 C = C + 2: POKE 49313,C
560 C = C - 1: POKE 49313,C
570 C = C - 1: POKE 49313,C
580 POKE 49324,192
590 POKE 49315,240
600 POKE 49324,192
610 POKE 49313,0
620 RETURN
630 REM REINITIALISEREN BIOCOUNTER
640 POKE 49315,255
650 POKE 49313,1
660 POKE 49324,0
670 POKE 49313,3
680 POKE 49313,1
690 RETURN
700 REM STATUSLIJN
710 TEXT
```

```
720 IF P = 0 THEN P$ = "UIT"
730 IF P = 1 THEN P$ = "AAN"
740 HTAB (10); VTAB (23)
750 PRINT "POMP ";AP;" PRINTER ";P$
760 RETURN
770 REM DISPLAY ROUTINE
780 REM IF INT ( VAL (G$) ) < 4 THEN RETURN
790 IF INT ( VAL (G$) ) > 7 THEN RETURN
800 TEXT : HTAB (1); VTAB (17)
810 IF P = 1 AND METINGNR% = 1 THEN PRINT CHR% (4)"PR#1"
815 HTAB (1); VTAB (17); PRINT "
      " : HTAB (1); VTAB (18); PRINT "
      " : HTAB (1); VTAB (17)
820 PRINT "METINGNR POMPNR OPTIE RLU"
825 PRINT "-----"
830 IF P = 1 THEN PRINT CHR% (4)"PR#1"
840 IF METINGNR% < > 0 AND INT ( VAL (G$) ) > 4 THEN PRINT TAB( 4);METINGNR% - 1; TAB( 17);A(METINGNR% - 1); TAB( 27);
M$(METINGNR% - 1,1); TAB( 34);C(METINGNR% - 1)
850 IF METINGNR% < > 0 THEN PRINT TAB( 4);METINGNR%; TAB( 17);A(METINGNR%); TAB( 27);;M$(METINGNR%,1); TAB( 34);C(METI
NINGNR%)
860 IF P = 1 THEN PRINT CHR% (4)"PR#0"
870 RETURN
880 VP% = VP% + 1;PRINTLINE$ = "DRUK OP EEN TOETS OM VERDER TE GAAN " : GOSUB 130: GET W$: PRINT "
      " : HOME : RETURN
890 RETURN
900 REM WEGSCHRIJVEN NAAR SCHIJF
910 RETURN
920 REM PLAATJE 1
930 POKE - 16299,0: POKE - 16297,0: POKE - 16302,0: POKE - 16304,0
940 RETURN
950 REM PLAATJE 2 APPLE CONTROLLING BIOCOUNTER
960 POKE - 16300,0: POKE - 16297,0: POKE - 16302,0: POKE - 16304,0
970 RETURN
980 D$ = CHR% (4)
990 S$ = "BLOAD BIOSCR1,A8192,S6,D1"
1000 PRINT D$;S$
1010 GOSUB 920
1020 S$ = "BLOAD BIOSCR2,A16384,S6,D1"
1030 PRINT D$;S$
1040 DIM A(100); DIM M$(100,1); DIM C(100)
1050 LET METINGNR% = 0: LET AP = 0
1060 LET G = 0: LET P = 0:G$ = "0"
1070 HOME : TEXT
1080 REM PROGRAMMA STURING DMV MENU
1090 GOSUB 170:VP% = 1:HP% = 10:PRINTLINE$ = " MENU KAART BIOCOUNTER " : GOSUB 130
1100 POKE 34,17: POKE 35,22
1110 INVERSE
1120 FOR I = 5 TO 13
1130 VP% = 1:HP% = 1:PRINTLINE$ = "< + STR% ( I - 4 ) + >": GOSUB 130
1140 NEXT : NORMAL
1150 VP% = 5:HP% = 5:PRINTLINE$ = "ADDITIE MBV POMP 1 " : GOSUB 130
1160 VP% = 6:HP% = 5:PRINTLINE$ = "ADDITIE MBV POMP 2 " : GOSUB 130
1170 VP% = 7:HP% = 5:PRINTLINE$ = "ADDITIE MBV POMP 3": GOSUB 130
1180 VP% = 8:HP% = 5:PRINTLINE$ = "METEN " : GOSUB 130
1190 VP% = 9:HP% = 5:PRINTLINE$ = "STANDAARDADDITIE MBV POMP 1&2": GOSUB 130
1200 VP% = 10:HP% = 5:PRINTLINE$ = "STANDAARDADDITIE MBV POMP 1&3": GOSUB 130
1210 VP% = 11:HP% = 5:PRINTLINE$ = "STANDAARDADDITIE AUTOMATISCH " : GOSUB 130
1220 VP% = 12:HP% = 5:PRINTLINE$ = "PRINTEN RESULTATEN AAN/UIT": GOSUB 130
1230 VP% = 13:HP% = 5:PRINTLINE$ = "SUB MENU DATAVERWERKING": GOSUB 130
1240 VP% = 16:HP% = 14:PRINTLINE$ = "OM KEUZE ?": GOSUB 130: FLASH : PRINT " " :; NORMAL
1250 GOSUB 700
1260 GOSUB 770
1270 HTAB (26); VTAB (16)
1275 @ = FRE (0)
1280 GET @
```

```
1282 IF G% = CHR% (13) THEN GOTO 2220
1290 IF VAL (G%) < 0 OR VAL (G%) > 9 THEN 1280
1300 ON INT ( VAL (G%)) GOTO 1320,1320,1320,1370,1480,1610,1700,1730,2220,2220
1310 GOTO 1250
1320 REM INITIËREN VAN POMP
1330 LET AP = INT ( VAL (G%))
1339 GOTO 1400
1340 GOSUB 700
1350 GOSUB 480
1360 GOTO 1250
1370 REM METEN
1380 HTAB (1): VTAB (20): PRINT "
1390 LET AP = 1
1400 GOSUB 700
1410 GOSUB 950
1430 GOSUB 480
1435 GOSUB 540
1440 GOSUB 240
1450 GOSUB 420
1460 GOSUB 630
1470 GOTO 1250
1480 REM STANDAARD ADDITIE MBV POMP 2
1490 GOSUB 950
1500 FOR QP = 1 TO 2
1510 AP = QP
1530 GOSUB 480
1535 GOSUB 540
1540 GOSUB 240
1550 GOSUB 420
1560 GOSUB 630
1570 NEXT QP
1580 TEXT
1600 GOTO 1250
1610 REM STANDAARD ADDITIE MBV POMP 3
1620 GOSUB 950
1630 FOR QP = 1 TO 3 STEP 2
1640 AP = QP
1650 GOSUB 480
1655 GOSUB 540
1660 GOSUB 240
1670 GOSUB 420
1680 GOSUB 630
1690 NEXT QP
1700 TEXT
1720 GOTO 1250
1730 LET P = P + 1: IF P > = 2 THEN P = 0
1750 GOTO 1250
1760 PRINT CHR% (13) CHR% (4)"CATALOG,D2": VTAB (22): HTAB (1): INPUT "NAAM TE SAVEN FILE :";NAAMS
1765 IF NAAMS = "" THEN GOTO 2220
1770 REM PRINT CHR% (13) CHR% (4)"DELETE"NAAMS
1780 PRINT CHR% (13) CHR% (4)"OPEN"NAAMS
1790 PRINT CHR% (13) CHR% (4)"WRITE"NAAMS
1800 PRINT METINGNR%
1810 FOR X = 1 TO METINGNR%
1820 PRINT X
1830 PRINT A(X)
1840 PRINT M$(X,1)
1850 PRINT C(X)
1860 NEXT X
1870 PRINT CHR% (13) CHR% (4)"CLOSE"NAAMS
1880 GOTO 2220
1890 REM GEGEVENS VAN SCHIJF
1892 ONERR GOTO 1991
```

```
1900 HTAB (1): VTAB (16): PRINT CHR$ (13) CHR$ (4)"CATALOG,D2"
1905 PRINT : PRINT
1910 VTAB (22): HTAB (1): INPUT "NAAM TE LADEN DATAFILE ? ";NAAM$
1912 IF NAAM$ = "" THEN HOME : GOTO 2220
1915 PRINT CHR$ (13) CHR$ (4)"VERIFY"NAAM$
1920 PRINT CHR$ (13) CHR$ (4)"OPEN"NAAM$
1930 PRINT CHR$ (13) CHR$ (4)"READ"NAAM$
1940 INPUT METINGNR:
1950 FOR X = 1 TO METINGNR:
1960 INPUT Q,A(X),M$(X,1),C(X)
1970 NEXT X
1980 PRINT CHR$ (13) CHR$ (4)"CLOSE"NAAM$
1990 GOTO 2220
1991 REM CALL 794
1992 IF PEEK (222) = 9 THEN PRNLINE$ = "DISKETTE IS VOL, VERVANG HEM DOOR EEN LEGE ":HP% = 1:VP% = 21: GOSUB 130: FOR I = 1 TO 9000:VP% = 23: GOSUB 880: GOTO 1890
1993 IF PEEK (222) = 8 THEN PRNLINE$ = "DISKETTE IS NIET TE LEZEN":VP% = 21:HP% = 1: GOSUB 130: FOR I = 1 TO 9000:VP% = 23: GOSUB 880: GOTO 1890
1994 IF PEEK (222) = 6 THEN PRNLINE$ = "FILE NIET GEVONDEN ":HP% = 10:VP% = 21: FLASH : GOSUB 130: FOR X = 1 TO 9000:VP% = 23:HP% = 1: NORMAL : GOSUB 880: GOTO 1890
1995 GOTO 2020
2000 VTAB (23): HTAB (1): PRINT "FILENAAM : ";NAAM$: HTAB (25): PRINT "RECORD(S) :";METINGNR:
2010 RETURN
2020 REM HARDCOPY VAN DE GEGEVENS
2030 GOSUB 170:VP% = 1:HP% = 11:PRNLINE$ = " PRINTEN GEGEVENS ": GOSUB 130
2040 IF METINGNR = 0 THEN VP% = 5:HP% = 1:PRNLINE$ = "ER ZIJN GEEN GEGEVENS OM TE PRINTEN ": GOSUB 130: FOR I = 1 TO 3000: NEXT : GOTO 2220
2050 VP% = 5:HP% = 1:PRNLINE$ = "ZET DE PRINTER AAN": INVERSE : GOSUB 130: NORMAL :VP% = 9:PRNLINE$ = "DRUK EEN TOETS OM VERDER TE GAAN ": GOSUB 130: GET W$
2060 HOME :VP% = 5:HP% = 1:PRNLINE$ = "PRINTEN " + NAAM$: FLASH : GOSUB 130: NORMAL
2070 PR# 1: POKE 1657,90: REM BREEDTE=90
2080 PRINT : PR# 0: PR# 1: REM NODIG VOOR PRINTERKUREN
2090 PRINT "MONSTERFILE: ";NAAM$
2100 PRINT : PRINT
2110 PRINT = "DATAFILE: BIOCOUNTER-" + NAAM$
2120 PRINT : PRINT
2130 PRINT "METINGNR      POMPNR  OPTIE  RLU"
2140 PRINT "-----"
2150 FOR X = 1 TO METINGNR:
2160 PRINT TAB( 4);X; TAB( 17);A(X); TAB( 26);M$(X,1); TAB( 33);C(X)
2180 NEXT X
2190 PRINT : PRINT "-----"
2200 PR# 0
2210 GOTO 2220
2220 REM SUB MENU
2230 HOME : GOSUB 170:VP% = 1:HP% = 8:PRNLINE$ = "SUBMENU GEGEVENSVERWERKING": GOSUB 130
2240 POKE 34,2: POKE 35,22
2250 INVERSE
2260 GOSUB 2000
2270 FOR I = 5 TO 11
2280 VP% = 1:HP% = 1:PRNLINE$ = "< + STR$ (I - 4) + ">": GOSUB 130
2290 NEXT : NORMAL
2300 VP% = 5:HP% = 5:PRNLINE$ = "GEGEVENS VAN SCHIJF": GOSUB 130
2310 VP% = 6:HP% = 5:PRNLINE$ = "GEGEVENS NAAR HET SCHERM": GOSUB 130
2320 VP% = 7:HP% = 5:PRNLINE$ = "GEGEVENS NAAR DE PRINTER": GOSUB 130
2330 VP% = 8:HP% = 5:PRNLINE$ = "GEGEVENS NAAR SCHIJF": GOSUB 130
2340 VP% = 9:HP% = 5:PRNLINE$ = "GEGEVENS WISSEN      ": GOSUB 130
2350 VP% = 10:HP% = 5:PRNLINE$ = "TERUG NAAR HET HOOFDMENU  ": GOSUB 130
2360 VP% = 11:HP% = 5:PRNLINE$ = "DOSCOMMANDO'S              ": GOSUB 130
2370 VP% = 16:HP% = 14:PRNLINE$ = "UW KEUZE ?": GOSUB 130
2380 HTAB (26): VTAB (16)
2390 GET B$
2392 IF B$ = CHR$ (13) THEN GOTO 1070
2400 IF VAL (B$) < 1 OR VAL (B$) > 7 THEN 2390
```

```
2410 ON INT ( VAL (6#)) GOTO 1890,2430,2020,1760,2590,1080,6000
2420 GOTO 2220
2430 HOME :MAX% = INT (METINGNR% / 10 + 0.5)
2440 IF METINGNR% = 0 THEN VP% = 5:HP% = 1:PRINTLINE$ = "ER ZIJN GEEN GEGEVENS !!!!! ": INVERSE : GOSUB 130: FOR I = 1 TO
3000: NEXT : GOTO 2220
2450 FOR Y = 0 TO MAX%
2460 HTAB (1): VTAB (7)
2470 PRINT "-----"
2480 PRINT "METINGNR      POMFNR  OPTIE  RLU"
2490 PRINT "-----"
2500 PRINT
2510 FOR X = 10 * Y + 1 TO 10 * Y + 10
2520 IF X > METINGNR% THEN 2560
2530 PRINT TAB( 4);X; TAB( 17);A(X); TAB( 26);M$(X,1); TAB( 33);C(X)
2540 NEXT X
2550 PRINT "-----"
2560 HTAB (1): VTAB (23): INVERSE : PRINT " DRUK OP EEN TOETS OM DOOR TE GAAN!! ": HTAB (1): VTAB (2): GET W#: HTAB (1)
: VTAB (23): PRINT "
": NORMAL : HOME
2565 IF X > = METINGNR% THEN GOTO 2220
2570 NEXT Y
2580 GOTO 2220
2590 REM ALLE GEGEVENS WISSEN
2600 HOME :VP% = 5:HP% = 1:PRINTLINE$ = "WAARSCHUWING " + CHR$(13) + "U GAAT ALLE GEGEVENS UITWISSEN" + CHR$(13) + "D
OORGAAAN (J/N) ? ": GOSUB 130
2610 GET W#
2620 IF W# = "J" THEN METINGNR% = 0:NAAM$ = "
"
2630 GOTO 2220
```