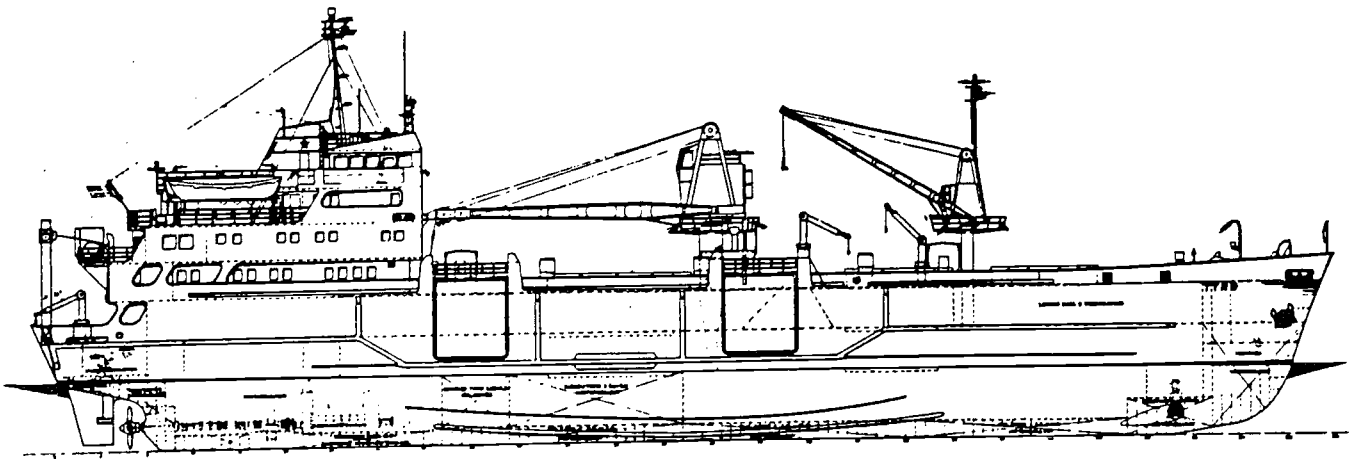


Bakteriële produktie op een noord-zuid  
raai in de Noord-Atlantische Oceaan:  
metingen tijdens JGOFS 1990



Doktoraal verslag Peter Quist  
RUG, Mariene Biologie, 04-'91  
Begeleiders:  
Dr. W.W.C. Gieskes  
Drs. T. Ietswaart

## INHOUDSOPGAVE

### Samenvatting

1	INLEIDING	5
1.1	Joint Global Ocean Flux Studies (JGOFS)	5
1.2	Mikrobiële loop	7
1.3	Bakteriële productie, respiratie en biomassa: methoden	9
1.3.1	Bakteriële dichtheid en biomassa	10
1.3.2	Bakteriële produktiviteit	13
1.3.3	JGOFS protocol	17
1.4	Vraagstelling	18
2	MATERIAAL EN METHODEN	19
2.1	Monstername	19
2.2	Bakteriële productie	20
2.2.1	Lineariteit	20
2.2.2	Konversiefactor	21
2.2.3	Tijdserie	21
2.3	Bakteriële biomassa	21
2.3.1	Bakteriële dichtheid	22
2.3.2	Biovolume	23
3	RESULTATEN	23
3.1	Bakteriële productie	23
3.1.1	Lineariteit	24
3.1.2	Konversiefactor	26
3.1.3	Tijdserie	26
3.2	Bakteriële biomassa	27
3.2.1	Bakteriële dichtheid	27
3.2.2	Biovolume	29
4	DISKUSSIE	29
4.1	Bakteriële productie	30
4.2	Bakteriële biomassa	31
4.3	Korrelatie met de primaire productie	31
5	KONKLUSIE	32

Literatuurlijst

Bijlage

## Samenvatting

In de periode van 4 mei tot 31 mei 1990 werd aan boord van R.V. "Tyro" in het kader van de Joint Global Ocean Flux Studies (JGOFS) de bacteriële produktie en biomassa gemeten op het traject Madeira - IJsland. De drie hoofdstations bevonden zich op 33°N 20°W, 47°N 20°W en 60°N 20°W. De in de eufotische zône gevonden bacterie-dichtheden waren over het gehele traject konstant; ze vielen binnen de range  $4 \cdot 10^8$ - $8 \cdot 10^8$  cellen  $\cdot l^{-1}$ . Dit komt overeen met  $8$ - $16 \mu g C \cdot l^{-1}$ . De dichtheid bleek voor de gehele waterfase een ondergrens te hebben van  $4 \cdot 10^7$  cellen  $\cdot l^{-1}$ . Dit komt overeen met  $0.99 \mu g C \cdot l^{-1}$ .

De bacteriële produktie nam van het zuiden naar het noorden gaande toe. Op 33°N bedroeg het produktiemaximum  $2.82 ng C \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$  op 35 m diepte, op 47°N  $3.81 \mu g C \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$  op 3 m diepte en op 60°N  $5.89 \mu g C \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$  op 2 m diepte. De bacteriële produktie was sterk gekorreleerd met de primaire produktie. Ongeveer 60% van de C-flow van de primaire producenten verliep via het bakterioplankton.

Dat de bacteriële produktie een ritmiek in de dag vertoonde met vlak na zonsopgang een maximale produktie is een extra aanwijzing voor een direkt verband tussen de primaire produktie en de bacteriële produktie. Om de bacteriële produktie te kwantificeren is meer kennis van deze ritmiek noodzakelijk.

Van deze ruimte wil ik gebruik maken om een ieder te bedanken die mij heeft geholpen tijdens het onderzoek. Dat zijn zowel mijn begeleiders in Haren, Thomas Ietswaart en Winfried Gieskes, als de gehele bemanning van R.V. Tyro, technici en opstappers. Met name noem ik Gijs Kraay voor het beschikbaar stellen van de primaire produktie getallen.

1

INLEIDING1.1 Joint Global Ocean Flux Studies (JGOFS)

JGOFS heeft als doel te onderzoeken in hoeverre de toenemende antropogene emissie van  $\text{CO}_2$  gereguleerd wordt door de oceanen en wat de processen zijn waardoor dit gebeurt. Hiertoe is een netwerk opgezet, waarbinnen verschillende landen participeren. Mijn taak was het bepalen van de bakteriële produktie en biomassa in de periode 4 mei - 31 mei tijdens JGOFS leg 3 aan boord van R.V. Tyro. Bakteriën spelen een belangrijke rol in de flow van organisch C (§ 1.2). De heterotofe activiteit van bakteriën verhoogt de  $\text{pCO}_2$ , terwijl de autotrofe activiteit van het fytoplankton een " $\text{CO}_2$ -sink" is. Bakteriën zijn potentiële konsumenten van fotosynthetisch gefixeerd materiaal. Voor een inzicht in de C-flow door het mariene systeem is het dus van belang zowel de autotrofe als de heterotrofe activiteit te kwantificeren en een mogelijke onderlinge relatie te achterhalen.

Het afgelegde traject met monsterstations is weergegeven in figuur 1.1.

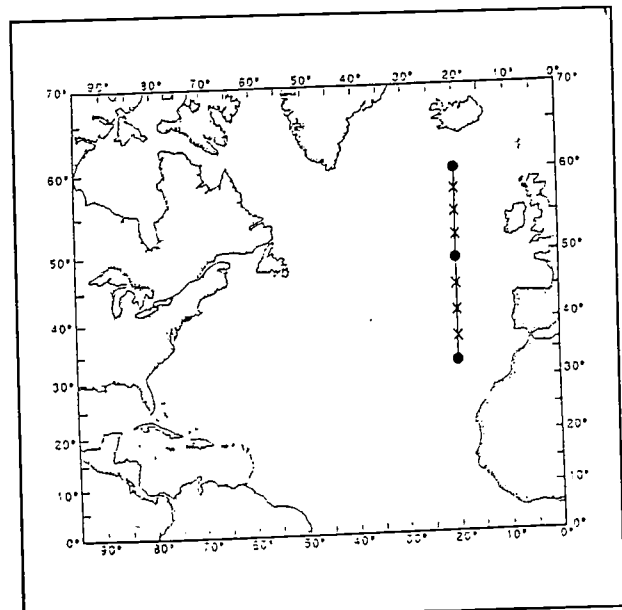


Fig 1.1 Afgelegde traject met daarin de superstations aangegeven.

Expeditietraject.

De dataset, op grond waarvan de C-flow werd gekarakteriseerd bestond uit de volgende parameters:

## Chemische parameters

- Zuurstof profiel (Vertikaal)
- Profiel nutriënten (nitraat, nitriet, ammonia, ortho-fosfaat en silica)
- $\text{CO}_2$
- TOC (total organic carbon)

- Sporemetalen
- Isotopen

Biologische parameters

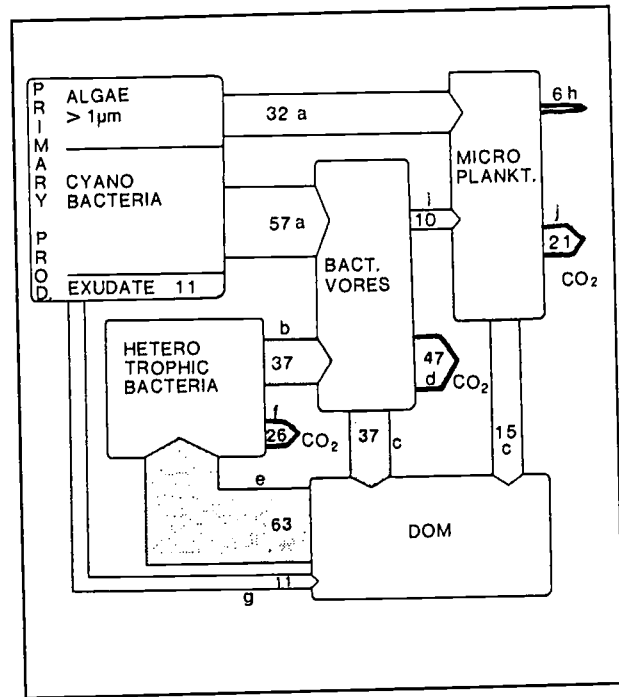
- Primaire produktie:  $^{14}\text{C}$ -assimilatie
- Pigmenten (fytoplankton)
- Bakteriële produktie en biomassa
- Zoöplanktongroeisnelheid en zoöplanktoneiproduktie
- Meso- en mikrozoöplanktonbiomassa
- Deep moored traps

## 1.2 Mikrobiële loop

Ons inzicht in het pelagische voedselweb is de laatste decenia ingrijpend veranderd. In het klassieke model (Steele, 1974) werden bacteriën opgevat als decomposers van faecaal materiaal in het benthos. Het is inmiddels echter duidelijk dat de biomassa en de activiteit van het bakterioplankton niet alleen een rol speelt in de mineralisatie van organisch materiaal, maar ook van belang is voor de fixatie van DOM, waardoor dit beschikbaar komt voor de hogere trofische niveaus. Nieuwe methoden om de biomassa, produktie en respiratie van bakterioplankton te meten tonen aan dat de bakteriële biomassa vaak hoog is en dat zij een groot deel vertegenwoordigt van het totale plankton (Bjørnsen, 1989). Bakteriële produktie ligt in de orde van 24% - 60% van de primaire produktie (Fuhrman & Azam 1980, 1982; Ducklow & Hill, 1985). Williams (1981) vond dat 50% van de respiratie van het plankton veroorzaakt wordt door organismen kleiner dan 1-3  $\mu\text{m}$ . Het blijkt dus dat in het pelagische systeem het bakterioplankton een belangrijke rol speelt in de flux van materiaal en energie. Voor een beter inzicht is het dan ook nodig dit deel van het pelagische voedselweb, de mikrobiële loop (Azam et al., 1983), voor wat betreft structuur en functioneren verder te onderzoeken (Laws et al., 1984; Ducklow et al., 1986; Azam & Cho, 1987).

Cole et al. (1988) en Bjørnsen et al. (1989) vonden een significante korrelatie tussen de primaire produktie en de bakteriële produktie. Dit suggereert een direct verband tussen beide functionele groepen. Dit geldt dan voornamelijk voor oceanen waar benthische en antropogene bronnen van nutriënten afwezig zijn, dit in tegenstelling tot estuaria waar het aanbod van allochtoon materiaal divers is. Bacteriën zijn osmotroef. Het substraat van het bakterioplankton bevindt zich dus in de fraktie opgelost organisch materiaal (DOM). Zoals uit het bovenstaande blijkt wordt  $\pm 50\%$  van de primaire produktie door bacteriën opgenomen. Het materiaal uit de primaire produktie bestaat in eerste instantie echter uit particulier organisch materiaal (POM) dat niet door bacteriën opgenomen kan worden. Het is dus de vraag welk mechanisme er toe leidt dat  $\pm 50\%$  van de primaire produktie in het DOM terecht komt. Hagström et al. (1988) vonden, voor een systeem waarin de bakteriële produktie hoog is en vergelijkbaar met de primaire produktie die voornamelijk uitgevoerd werd door cyanobacteriën, dat  $\pm 10\%$  van de primaire produktie direct in de vorm van DOM vrijkwam door exudatie. De overige produktie kwam ten goede aan het mikroplankton. Ook van deze fraktie zal een belangrijk deel in het DOM terecht komen door exkretie en lysis. Slechts 6% van de primaire produktie komt beschikbaar voor de hogere trofische niveaus. Een belangrijk deel van het fotosynthetisch gefixeerde koolstof wordt binnen de mikrobiële loop gemineraliseerd, zodat de loop dus gekenmerkt kan worden als een sink voor energie (fig 1.2).

Fig 1.2 C-flux in een door cyano-  
bacteriën gedomineerde microbiële  
loop (Hagström et al., 1988).  
a: C-flow van cyanobacteriën en fy-  
toplankton ( $>1\mu\text{m}$ ) naar bakterio-  
foren en mikroplankton.  
b: Predatiedruk op bacteriën.  
c: C-flow van bakterioforen en  
mikroplankton naar DOM.  
d: respiratie.  
e: C-flow van DOM naar bacteriën.  
f: bakteriële respiratie  
g: Organisch exudaat  
h: C-flow naar hogere trofische  
nivo's  
i: C-flow van bakterioforen naar  
mikroplankton  
j: mikroplankton respiratie.



Ook sloppy feeding is een mechanisme waardoor een belangrijk deel van de primaire produktie beschikbaar komt voor bacteriën (Lampert, 1978; Copping and Lorenzen, 1980). Daarnaast komt een deel van het door herbivoren zoöplankton opgenomen materiaal door inefficiënt gebruik voor een deel beschikbaar in de vorm van faecal pellets. De stimulatie van de microbiële activiteit door grazende herbivoren is dan ook voor een groot aantal milieus aangetoond (Hamilton, 1973; Fenchel & Harrison, 1976; Abrams and Mitchel, 1980). Het effect van virussen op fytoplankton is steeds onderschat. Het wordt nu duidelijk dat zij algemeen voorkomen onder vertegenwoordigers van de verschillende taxa marien fytoplankton (Suttle et al., 1991). Wat het effect van virussen (fytoplanktonfagen) is op de flow van nutriënten en energie is nog onbekend. Het verdient dan ook extra aandacht. Nu bacteriën zo'n dominante rol blijken te spelen in zowel de energiestroom als in de koolstofstroom door het systeem wordt het belang van betrouwbare methoden om de bakteriële produktie, respiratie en biomassa te kwantificeren onderkend. Er is de laatste jaren dan ook veel over gepubliceerd.

### 1.3 Bakteriële produktie, respiratie en biomassa: methoden

Pelagische bacteriën zijn klein, terwijl zij in grote dichtheden voorkomen (Tabel 1.1). Hierdoor ontstaan 2 problemen:

- Het totale aantal is moeilijk te bepalen doordat de bacteriën gemakkelijk aan de aandacht ontsnappen.
- Er ontstaat een grote fout wanneer de biomassa bepaald wordt door het celvolume te vermenigvuldigen met de dichtheid. De fout in het bepaalde celvolume wordt dan vermenigvuldigd met de fout in de dichtheid.

Tabel 1.1 Dichtheden en bacteriële produktie, zoals die door verschillende onderzoekers gevonden werd voor het mariene systeem (Van Es & Meyer-Reil, 1982).

Area	Sampling depth (m)	Number of stations	Number of cells $\times 10^7$ /liter	Bacterial biomass $\mu\text{g C/liter}$	Reference
Coastal and Estuarine waters					
U.S. east coast	0-20	3	5.5-6.8	5.2-6.0	Ferguson and Rublee, 1976
U.S. east coast	0-50	7	21		Ferguson and Palumbo, 1979
U.S. east coast	5	1	18		Johnson and Sieburth, 1979
U.S. east coast	5	3	23	63.3	Sieburth <i>et al.</i> , unpubl. data
U.S. East Coast Essex estuary					
Inner part	1	3	68		Wright, 1978
Inlet	1	1	49		
Outside	1	5	29		
U.S. East coast Newport River estuary	0-2	4	61		Palumbo and Ferguson, 1978
U.S. East coast North Inlet High marsh creeks	0.2	3	78		Wilson and Stevenson, 1980
Primary tidal channel	0.2	1	23		
English estuaries					
Humber summer	Surface	1	64		Goulder, 1977
Humber winter	Surface	1	133		
Tyne winter	Surface	1	264		
Offshore and oceanic waters					
N.W. Atlantic, continental shelf	0-600	2	6.7		Ferguson and Palumbo, 1979
N.W. Atlantic, continental shelf	5	7	10.4	5.3	Sieburth <i>et al.</i> , unpubl. data
Sargasso Sea	5	1	4.2		Johnson and Sieburth, 1979
	50	2	2.3		
	100	3	2.0		
Sargasso Sea	3-400	1	0.2-0.5	0.7	Liebezett <i>et al.</i> , 1980
	900-1500	1	0.1		Carlucci and Williams, 1978
North Central Pacific	1	1	1.4		
	75	1	0.5		
	500	1	0.2		
	1500	1	0.07		
	5550	1	0.05		Hobbie <i>et al.</i> , 1977
Deep waters off Africa	Surface		16		
	4200		0.3		
Antarctic water under Ross Ice Shelf	66-200	1	0.1	0.1	Azam <i>et al.</i> , 1977

Daarom zijn er alternatieve methoden ontwikkeld, gebaseerd op de chemische analyse van celbestanddelen. Deze indirecte methoden zijn gebaseerd op de aanname dat het onderzochte bestanddeel een vaste fraktie is van de celmassa (biomassa). Tabel 1.2 geeft de meest toegepaste directe en indirecte methoden voor de bepaling van de dichtheid en biomassa.



Ook de bepaling van de *in situ* produktie kampt met een aantal problemen. Het is moeilijk om de produktie door de proefopstelling niet te beïnvloeden. Bovendien is het aantal fysiologische typen organismen zeer divers, waardoor de mogelijkheid aanwezig is dat niet de produktie van het gehele bacterioplankton gemeten wordt, maar van slechts een subpopulatie hiervan (§1.3.2).

Het is van belang te weten hoeveel CO<sub>2</sub> verloren gaat door respiratie. Het bepaalt niet alleen de efficiëntie waarmee C beschikbaar komt voor de hogere trofische nivo's maar het is ook een belangrijke determinant die aangeeft of bacteriën als konsumenten dan wel als mineraliseerders aangemerkt moeten worden. Groeisnelheid, substraatlimitatie en de vorm van de koolstofbron zijn factoren die de respiratie sterk beïnvloeden. De range van gemeten respiratiecoëfficiënten (% C dat geoxideerd wordt tot CO<sub>2</sub>) ligt tussen de 44% en 75% (Thingstad, 1987). Een deel van deze grote variatie wordt veroorzaakt door experimentele fouten.

- |   |
|---|
| <p>A. Methods that trace the fate of specific substrates</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Biological oxygen consumption rate (BOC) and diurnal oxygen curve analysis</li> <li>b. Heterotrophic <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fixation</li> <li>c. Uptake kinetics of organic substrates</li> <li>d. Turnover time of substrates added at trace concentrations</li> <li>e. Rate of nucleotide incorporation into RNA and DNA</li> </ul> <p>B. Methods that follow changes within the bacterial community</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>f. Increase in cell number during incubation of a sample without predators present</li> <li>g. Increase in cell length after incubation with naladixic acid</li> <li>h. Increase in cell numbers on membrane filters in contact with natural water</li> <li>j. Increase of biomass in dialysis containers in contact with natural water</li> <li>k. Determination of washout rate in a continuous culture</li> <li>l. Increase in cell numbers or cell length on submerged glass slides</li> <li>m. Determination of frequency of dividing cells</li> </ul> |
|---|

Tabel 1.2 (Van Es & Meyer-Reil, 1982).

### 1.3.1 Bakterie dichtheid en biomassa

Licht-mikroskopie heeft het belangrijke nadeel dat zelfs na kleuring van de monsters of gebruik makend van een fasekontrast-mikroskoop veel bacteriën onherkenbaar blijven. Verder is de methode subjektief en bewerkelijk.

Door bacteriën te kleuren met fluorochroom, b.v. DAPI, acridine oranje of Hoechst dye (Porter & Feig, 1980; Hobbie et al., 1977; Paul, 1987), neemt de mogelijkheid tot differentiatie toe (Francisco et al., 1973). Door polycarbonaatfilters te gebruiken wordt het mogelijk kleine cellen (< 0.5 µm) te tellen en te differentiëren naar grootte-klasse. Polycarbonaatfilters zijn superieur ten op zichte van filters gebaseerd

op cellulose-esters (Millipore en Sartorius) door hun vlakke oppervlak met gedefinieerde poriegrootte en lage retentie van fluoro-chroom (Hobbie et al., 1977). In de sponzige structuur van de cellulose-esterfilters kunnen bovendien kleine kokken penetreren.

Om fouten op grond van subjectiviteit te verkleinen moet het getelde object aan een aantal vereisten voldoen:

- Scherpe omgrenzing
- Herkenbare vorm
- Heldere fluorescentie (Meyer-Reil, 1977)

De ratio van de vrij-levende en de gebonden bacteriën kan relatief eenvoudig bepaald worden. Tot voor kort werd aangenomen dat de meeste bacteriën in het pelagiaal gebonden waren aan verschillende oppervlakten (Darnell, 1967; Seki, 1972). Het lijkt er nu echter op dat steeds het bacterioplankton over het hoofd is gezien. Gekonkludeerd moet worden dat het grootste deel van de bacteriën vrij levend zijn (Wiebe & Pomeroy, 1972; Hobbie et al., 1972; Hollibough et al., 1980), hoewel in estuaria en kustwater het aantal gebonden bacteriën relatief veel hoger is (Watson & Stevenson, 1980).

Voor de bepaling van de biomassa op grond van epifluorescentie mikroskopie is een konversiefactor nodig van volume naar biomassa. Fuhrman (1981) heeft op verschillende wijzen het biovolume bepaald en konkludeerde dat epifluorescentie mikroskopie het volume het beste benadert. In tabel 1.3 staan de celvolumina en konversiefactoren zoals die door verschillende onderzoekers gevonden werden weergegeven.

<i>Celvolume</i>		
Palumbo et al., 1984	marien	0.072-0.096 $\mu\text{m}^3 \cdot \text{cel}^{-1}$
Turley & Lochte, 1986	marien	0.11-0.2 $\mu\text{m}^3 \cdot \text{cel}^{-1}$
Riemann et al., 1986	kust	0.020-0.115 $\mu\text{m}^3 \cdot \text{cel}^{-1}$
<i>Biomassa</i>		
Bratbak, 1985		560 fg C $\cdot \mu\text{m}^{-3}$
Bjørnsen, 1986		350 fg C $\cdot \mu\text{m}^{-3}$
Lee & Fuhrman 1987		380 fg C $\cdot \mu\text{m}^{-3}$
		20 fg C $\cdot \text{cel}^{-1}$

Tabel 1.3

### Viable count

De klassieke methode is het bepalen van het aantal kolonievormende bacteriën (CFU: colonie forming units) op agarplaten. Slechts een fractie (0.0001%- 10%) van de totale populatie wordt geteld. Het verschil tussen de viable count en de total count heeft verschillende oorzaken:

- Aanwezigheid van rustende cellen.
- De fysisch-chemische inkubatiekondities zijn niet geschikt voor groei van een deel van de populatie.
- Cellen groeien te langzaam om binnen de gekozen inkubatie-tijd tot kolonies uittegroeien.

- Inaktivatie door andere cellen.
- Inaktivatie door bewerking. Bijvoorbeeld door temperatuur-, druk- of zuurstofshock.
- Cellen hebben de neiging zich aan glasoppervlakten te hechten. Hierdoor worden ze uit het monster genomen tijdens het pipetteren en andere bewerkingen.

De relatieve eenvoud van de techniek verklaard dat deze techniek toch nog vaak wordt toegepast. Een variatie is de MPN (Most Propable Number) telling (De Man, 1975). Deze techniek is gebaseerd op het verdunnen van het monster tot theoretisch 1 cel per monster. De hoogste verdunning waarin nog groei optreedt geeft de dichtheid aan waarin het organisme voorkwam. Ook deze methode heeft het nadeel dat de uitkomsten afhankelijk zijn van het gekozen medium en de overige fysisch-chemische kweekcondities.

#### Chemische analyse

Door gebruik te maken van de chemische analyse van een celbestanddeel van het bakterioplankton kunnen de nadelen van de hierboven genoemde technieken omzeild worden. De bruikbaarheid van de techniek is afhankelijk van de gekozen indikator. Hieraan moeten verschillende eisen gesteld worden:

- Het moet in alle levende cellen voorkomen en in alle dode cellen afwezig zijn.
- Het moet niet geassocieerd zijn met anorganisch materiaal en detritus.
- Het moet op een redelijk konstant nivo in de cellen voorkomen, onafhankelijk van staat waarin de cel zich bevindt.
- De analytische techniek voor de bepaling van de indikator moet een drempelwaarde hebben van submicrogram hoeveelheden.

(Holm-Hansen, 1973).

Twee indicatoren die hier redelijk aan voldoen zijn ATP en celwandbestanddelen.

De konversiefactor van ATP naar cel koolstof is voor een skala aan organismen onder sterk variërende condities bepaald en blijkt nogal te variëren, afhankelijk van de fysiologische condities en de soort. Voor een gemengde populatie blijkt een C/ATP ratio van 250 een aanvaardbare schatting te zijn (Karl, 1980). Totaal adenine nucleotide (AMP+ADP+ATP) heeft een sterkere korrelatie met biomassa. Soms echter komt AMP in significante hoeveelheden buiten de cel voor (Davis & White, 1980).

In tegenstelling tot ATP zijn de celwandbestanddelen muraminezuur en lipopolysaccharide (LPS) specifiek voor bacteriën. Muraminezuur is het belangrijkste bestanddeel van de membraan van gram-positieve bacteriën en is ook aanwezig in de peptidoglycanlaag van gram-negatieve bacteriën. LPS komt alleen bij gram-negatieve bacteriën voor. Beide zijn een functie van het celoppervlak en niet van het volume. Voordat de konversie naar biomassa kan worden gemaakt moet het gemiddelde volume bepaald

worden. Er is een sterke temporele en spatiële variatie in het celvolume van bacteriën. Bovendien vonden Marin & Veldkamp (1978) dat de oppervlakte-volume ratio verandert met de fysiologische staat van de bacterie. Het is dus raadzaam de konversiefactor voor de gegeven omstandigheden te bepalen.

### 1.3.2 Bakteriële productie

Dichtheid en biomassa van het bacterioplankton geeft geen dynamiek aan. Voor het achterhalen van de energie- en koolstofstroom door het voedselweb is het nodig de productie te bepalen.

De *in situ* bakteriële activiteit is moeilijk te bepalen, omdat bacteriën zeer snel reageren op relatief kleine veranderingen in het milieu. Om deze productie toch zo goed mogelijk te benaderen is een aantal verschillende technieken ontwikkeld:

- BOC (Biological oxygen consumption)
- $^{14}\text{CO}_2$  opname (heterotroof)
- Enzymactiviteit
- Toename celdichtheid
- Frekwentie delende cellen
- Nukleotide inbouw in RNA en DNA

Een fundamenteel bezwaar tegen inkubatie in gesloten vaten is dat een open systeem gereduceerd wordt tot een gesloten systeem. Dit kan een direkt effect op het metabolisme hebben.

Biological Oxygen Consumption (BOC).

$\text{O}_2$  is de terminale elektronen-akseptor in de aerobe mineralisatie. Omdat de  $p\text{O}_2$  in veel milieus ook een belangrijke ekologische parameter is is de BOC een veel toegepaste bepaling. De BOC van watermonsters kan met een precisie van  $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  bepaald worden (Bryan et al., 1976). Verder heeft de techniek als voordeel dat  $\text{O}_2$  een natuurlijk en universeel substraat is, zodat geen toevoegingen nodig zijn. Voor oligotrofe en koude milieus is de techniek echter te ongevoelig. Een oplossing zou zijn om de monsters te konsentreren (Pomeroy & Johannes, 1968). Holm-Hansen et al. (1970) vonden echter een drastische afname van de ATP-pool in oceaanmonsters die voor BOC gekonstreerd werden.

De BOC in het donker kan uitgedrukt worden in organische C mineralisatie, wanneer een respiratiecoëfficiënt bepaald of aangenomen wordt en de oxidatie van anorganisch materiaal (b.v.  $\text{NH}_4^+$ ) klein is. Ogura (1972) en Zsolnay (1975) vonden respiratiecoëfficiënten die tussen de 0.7 en 1.0 ( $\text{mol O} \cdot \text{mol}^{-1} \text{C}$ ) liggen voor de eenvoudig afbreekbare fraktie in het oppervlakte zeewater.

$^{14}\text{CO}_2$  opname (heterotroof).

Tijdens groei benutten bacteriën een deel van de intermediairen uit de citroenzuurcyclus om aminozuren en andere monomeren van celbestanddelen te synthetiseren. Het verlies aan intermediairen wordt gekompenseerd door anaplerotische  $\text{CO}_2$ -fixatie,

waarbij voornamelijk pyruvaat maar ook fosfoenolpyruvaat gekarboxyleerd wordt tot oxaalacetaat (Kornberg, 1966). Wanneer er een konstant verband bestaat tussen de biosynthese en anaplerotische CO<sub>2</sub>-fixatie kan de bakteriële produktie bepaald worden zonder de biomassa of groeisnelheid van de populatie te weten.

De monsters worden geïnkubeerd in het donker met <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. De bakteriële produktie wordt dan bepaald aan de hand van de Steeman-Nielsen-formule en een konversiefactor (CO<sub>2</sub> fixatie (donker) → heterotroofe biomassa produktie). De konversiefactoren liggen in de orde van 0.03 - 0.10 (Sorokin, 1964, 1971; Romanenko, 1964).

Jordan & Likens (1980) vonden dat de bakteriële produktie 2 tot 5 maal overschat werd wanneer anoxische pockets (b.v. marine snow) niet uitgesloten konden worden, door de aanwezigheid van een actieve populatie nitrificatoren, zwavel-oxideerders en of methylofrotrofen die veel meer CO<sub>2</sub> in het celmateriaal opnemen dan de aerobe heterotrofe organismen.

Enzymaktiviteit.

Ook de bepaling van de enzymaktiviteit biedt de mogelijkheid de mineralisatieprocessen *in situ* te bestuderen. Exo-enzymen zijn direkt meetbaar in het medium, terwijl endo-enzymen door mechanische manipulatie of lysis vrijkomen.

Verschillende enzymen zijn als ekskretieprodukten van mariene bakteriën gedetekteerd (Corpe & Winters, 1972; Corpe 1974) in kultuurmedia maar ook in natuurlijke wateren en sedimenten (Kim & ZoBell, 1974): fosfatase, amylase, β-glukosidase en proteïnases.

Naast bakteriën zorgen ook alle overige dode en lyserende cellen voor het vrijkomen van enzymen (Meyer-Reil, 1981). Energie-budgettair gezien is het niet aannemelijk dat er kontinu enzymekskretie plaats vindt. Bovendien is de gedachte aan enzymen vrij in de waterfase te simplistisch. Burns (1980) toonde aan dat enzymen complexeren met bodembestanddelen.

Toename celdichtheid.

Hierbij wordt er vanuit gegaan dat het effect van bakterioveren opgeheven wordt door filtratie van het monster. Het filtraat wordt dan onder gesimuleerde *in situ* kondities geïnkubeerd, gedurende t<sub>d</sub>. Op t<sub>0</sub> en t<sub>1</sub> worden de aantallen bakteriën N<sub>0</sub> en N<sub>1</sub> mikroskopisch bepaald. De generatietijd g wordt dan gegeven door:

$$g = \frac{\log 2}{\log N_1 - \log N_0} * (t_1 - t_0)$$

Wanneer echter niet gecorrigeerd wordt voor de rustende cellen wordt de g sterk overschat. Om hiervoor te corrigeren wordt de konstante '2' in de teller aangepast. Bij een aangenomen actieve fraktie van 90% wordt de konstant 1.8. Dit is een

grove benadering. Rustende cellen werken door in de  $N_0$  en korrektiefactoren zouden daarom in de noemer moeten staan. De resultaten worden sterk bepaald door de inkubatieomstandigheden. Hierop zijn dan ook veel variaties mogelijk. Onder andere de inkubatie in diffusiekamers om nutriënt-limitatie te voorkomen en kontinukultuur (kk) (Pirt, 1975).

Frekwentie delende cellen (FDC).

Hagström et al. (1979) vonden in kk een positieve korrelatie tussen fdc en de groeisnelheid. Met deze korrelatie en de gemeten fdc wordt het mogelijk de groeisnelheid van een gemengde populatie te bepalen zonder inkubatie. Verder vonden Larsson & Hagström (1982) een significante positieve korrelatie tussen het gemiddelde celvolume en de fdc van een gemengde populatie. Hierdoor wordt het mogelijk zowel de groeisnelheid als de produktie te bepalen aan de hand van de fdc. Nadeel van de methode is dat de korrelaties bepaald worden aan de hand van kk-werk. Een kontinukultuur is selektief voor groeiende cellen, terwijl deze in natuurlijke systemen waarschijnlijk in de minderheid zijn. Bovendien zijn delingen bij de zogenaamde mini-cellen moeilijk te zien.

Opname nucleotiden

DNA wordt alleen gesynthetiseerd door groeiende cellen met een snelheid die evenredig is met de vorming van biomassa, omdat de hoeveelheid DNA per cel konstant is en de turn-over van DNA verwaarloosd mag worden (Maaløe & Kjeldgaard, 1966). De synthese van DNA geeft de groeisnelheid dus nauwkeurig weer. De techniek is gebaseerd op de toediening van  $^3\text{H}$ -thymidine dat vervolgens in het DNA ingebouwd wordt. De thymine-base inbouw in DNA verloopt via 2 routes, de zogenaamde "salvage pathway" en de "novo pathway" (fig 1.4).

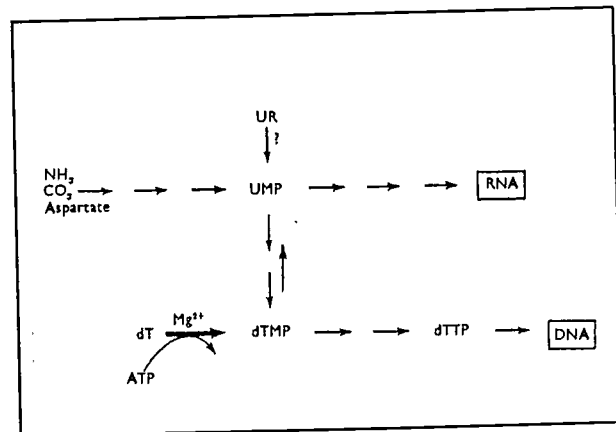


Fig. 1.4 De novo en salvage en de pathway voor de thymine inbouw in DNA (Grivell & Jackson, 1968).

De toegediende hoeveelheid  $^3\text{H}$ -thymidine moet in verhouding tot de pool zo groot zijn dat de novo synthese uitgeschakeld wordt. Experimenten waarbij de  $^3\text{H}$ -thymidine concentraties gevarieerd werden leidde tot een verdubbeling tot verdrievoudiging van de bepaalde groeisnelheid, terwijl de hoeveelheid isotoop dat werd toege-

voegd 20-100 voudig varieerde. Moriarty & Pollard (1981) waarschuwen dat er niet zondermeer vanuit gegaan kan worden dat "de novo synthese" stilgelegd wordt of zelfs maar vermindert door een hoge dosis  $^3\text{H}$ -thymidine. Het blijft dan van belang de specifieke aktiviteit van de nukleoside-prekursor te meten. De bepaling leidt tot een onderschatting van de bakteriële produktie wanneer er zonder meer van wordt uitgegaan dat de novo synthese stil ligt. Het  $^3\text{H}$ -thymidine blijkt voor meer dan 80% in het DNA te worden ingebouwd (Fuhrman & Azam, 1980). Het overige komt in andere biopolymeren terecht. Wicks & Robarts (1987) beschreven een methode om het DNA te extraheren en te zuiveren, waardoor de bakteriële produktie beter wordt benaderd. Fuhrman & Azam (1980) toonden aan dat wanneer  $^3\text{H}$ -thymidine in konzentraties van 11 nM of minder wordt toegevoegd het voor meer dan 90% door bakteriën wordt opgenomen. Door de methylgroep van thymidine te labelen wordt voorkomen dat het label in het RNA terecht komt, omdat tijdens de synthese van uridine en cytidine uit thymidine de methylgroep verloren gaat. Het label blijkt dus specifiek in het DNA terecht te komen en DNA is een nauwkeurige parameter voor produktie. Helaas wordt thymidine niet door alle bakteriën ingebouwd. Voor chemolithotrofen, sulfaatreduceerders en gebonden bakteriën is beschreven dat ze geen  $^3\text{H}$ -thymidine inbouwen (Johnstone & Jones, 1989; Gilmour, 1990; Fallon & Newell, 1986). In milieus waar zij een belangrijk deel van de populatie vertegenwoordigen wordt de produktie dus onderschat en zou het beter zijn een andere techniek te volgen.

Zoals uit het bovenstaande blijkt moet een aantal parameters bekend zijn om de produktie uit de  $^3\text{H}$ -thymidine inbouw af te kunnen leiden:

- Deel van de radioaktiviteit dat zich in de DNA fraktie bevindt
- De intracellulaire specifieke aktiviteit van van dTTP moet bekend zijn. dTTP is de direkte precursor van DNA, die uiteindelijk afkomstig is van thymidine (Fig. 1.4).
- Fraktie thymidineresiduen in DNA moet bekend zijn.
- De hoeveelheid DNA per cel moet bekend zijn om aan de hand van de DNA synthese de snelheid van celdaanwas te kunnen bepalen.

Voor zover mogelijk is de bepaling van de afzonderlijke parameters erg tijdrovend. Het kan omzeild worden door het bepalen van de konversiefaktor volgens Kirchman et al., 1982. Hierbij wordt tegelijkertijd de inbouw van  $^3\text{H}$ -thymidine en de toename van de celdichtheid en de biomassa in de tijd bijgehouden. De range van gepubliceerde konversiefactoren loopt van  $1 \cdot 10^{18}$  cellen·mol  $^3\text{H}$ -thymidine -  $7.5 \cdot 10^{18}$  cellen·mol  $^3\text{H}$ -thymidine (Coveney & Wetzel, 1988; Bell, 1990).

### 1.3.3 Het JGOFS protocol

Voor JGOFS is gekozen voor een uniform protocol. Het protocol maakt gebruik  $^3\text{H}$ -thymidine inbouw voor de bepaling van de bakteriële produktie. De bakteriedichtheid en celvolume werden bepaald aan de hand van epifluorescentie-mikroskopie (Zie materiaal en methoden hdst 2). Voor de konversie van dichtheid en biovolume naar biomassa werd van de konversiefactoren van Lee & Fuhrman (1987: 20 fg C·cel<sup>-1</sup>, 380 fg C· $\mu\text{m}^{-3}$ ) gebruik gemaakt.

De produktiebepaling op grond van thymidine-inbouw heeft z'n beperkingen, maar wanneer aan de randvoorwaarden wordt voldaan is het een snelle en eenvoudige methoden, waarmee de bacteriële aktiviteit nauwkeurig bepaald kan worden. Bovendien is de methode wijd verspreid (Fuhrman & Azam, 1980, 1982; Rieman et al., 1982; Kirchman et al., 1985; Simon & Azam, 1989).



#### 1.4 Vraagstelling

Het onderzoek was in eerste instantie gericht op de kwantificatie van de bakteriële produktie ( $\mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}$ ) en biomassa ( $\mu\text{g C}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Deze produktie werd op drie hoofdstations, respektievelijk  $33^{\circ}\text{N } 20^{\circ}$ ,  $47^{\circ}\text{N } 20^{\circ}\text{W}$  en  $60^{\circ}\text{N } 20^{\circ}\text{W}$ , van het oppervlak tot aan de bodem gemeten.

Uit de literatuur blijkt er een sterke korrelatie te zijn tussen de primaire - en bakteriële produktie. Hier werd onderzocht of dat ook op de gekozen hoofdstations gold. De korrelatie geeft een indikatie van de afstand tussen beide trofische niveaus. Verder werd onderzocht in hoeverre naast de primaire produktie ook de bakteriële produktie in de loop van de dag varieert. Wanneer er namelijk, zoals bij de primaire produktie, een sterke ritmiek optreedt is het van belang meerdere keren per dag de produktie te bepalen om tot een juiste bakteriële produktie per dag te komen. Op grond van een eenmalige meting zal in het geval dat de produktie sterk over de dag varieert een over- of onderschatting van de bakteriële produktie plaats vinden.

## 2

MATERIAAL EN METHODEN2.1 Monstername

Monstername verliep volgens het JGOFS protocol en werd synchroon uitgevoerd met de monstername voor de primaire produktie. Tussen 5 mei en 31 mei 1990 werd gemonsterd op de stations die zich op respectievelijk 33°N 20° (#30), 47°N 20°W (#51) en 60°N 20°W (#81) bevonden (fig 1.1).

Monstername in de eufotische zône gebeurde op 7 lichtdieptes, respectievelijk 65%, 33%, 14.5%, 6.4%, 3.0%, 1.8% en 0.5% van de oppervlakte-instraling (deze dieptes werden steeds een dag van te voren bepaald).

Bij zonsopgang werd tot ± 200 m diepte gemonsterd, de eufotische zône en drie aanvullende dieptes tussen de 75 en 200 m. Later op de dag werd de rest van de waterkolom bemonsterd.

Beneden de eufotische zône is een dagelijkse ritmiek onder invloed van het daglicht niet aannemelijk. Op de monitor van de CTD was tijdens het afdalen van de Rosette-sampler en CTD te zien hoe het profiel van de chlorofylkonsentratie, zuurstofkonsentratie, temperatuur en saliniteit in de diepte verliep. Op grond van deze gegevens werden de dieptes bepaald waar het best monsters van beneden de eufotische zône genomen konden worden. Dit waren onder andere zuurstofminima, chlorofylmaxima en de pycnocline.

Uit de rosettesampler werden submonsters genomen in polycarbonaat flessen die donker werden gehouden tot de verwerking. De zo verkregen monsters werden direkt naar het lab overgebracht waar ze verwerkt werden. Per diepte is 100 ml nodig. 40 ml werd direkt gefixeerd met 3.5 ml 25% 0.2 µm gefiltreerde formaline voor bepaling van de bakteriedichtheid en biomassa (§ 2.3), de rest werd gebruikt voor de aktiviteitsbepaling (§2.2).

2.2 Bakteriële produktie (Kirchman et al., 1982)

De bakteriële produktie werd bepaald aan de hand van de thymidine incorporatie.

Reagentia

1. <sup>3</sup>H-thymidine 12.5 µM (<sup>3</sup>H-TdR, Amersham, 82 Ci·mmol<sup>-1</sup>)
2. 5% trichloorazijnzuur (TCA)
3. Fenol/Chloroform 50% w/v
4. 80% ethanol (EtOH)
5. Instagel
6. Formaldehyde 25%

Bepaling

1. Voeg aan 50 ml monster 3H-TdR toe tot een eindkonsentratie van 5 nM (inkubatie in polycarbonaat potten).
2. Meng goed en fixeer (punt 4) direkt in duplo 20 ml monster

- (Blanko). Zie punt 5 voor de verdere verwerking van de blanco's.
3. De monsters van boven de thermocline worden in het donker geïnkubeerd bij de temperatuur die in de oppervlakte laag heerst. De overige monsters worden op de temperatuur die juist onder de thermocline heerst geïnkubeerd.
  4. Na 60 min wordt de inkubatie gestopt door 1.75 ml 25% formaldehyde aan 20 ml monster toe te voegen.
  5. Filtreer in duplo 10 ml monster onder laag vacuum (0.2 atm) af op 25 mm cellulose nitraat filters (poriegrootte 0.2  $\mu\text{m}$ , Sartorius).
  6. Verwijder onderdruk en voeg 3 ml ijskoude 5% TCA toe aan ekstrakt. Na respectievelijk 60 en 120 s wordt nog eens 1.5 ml ijskoude 5% TCA toegevoegd. Na 180 s onder laag vacuum affiltreren.
  7. Wanneer de TCA is doorgelopen 5\* spoelen met 1.5 ml ijskoude 5% TCA. Breng de volgende pas op wanneer de vorige geheel is doorgezogen.
  8. Onderdruk verwijderen en 5 ml fenol/chloroform 50% w/v opbrengen. Na 180 s extraheren affiltreren (Deze stap alleen voor de monsters die volgens de methode van Wicks en Robarts, 1989, verwerkt worden).
  9. Onderdruk verwijderen en 5 ml ijskoude 80% EtOH opbrengen. Na 180 s affiltreren.
  10. Filter overbrengen in een scintillatiepotje en 12 h laten drogen. 5 ml instagel toevoegen. Na het oplossen van het filter suspensie schudden.
  11. Aktiviteit van de monsters doormeten op de scintillatie counter (LKB, Rackbeta).

### 2.2.1 Lineariteit

Om te controleren of de konsentrasie 3H-TdR (5 nM) het monster gedurende de gehele inkubatie verzadigd werd de lineariteit bepaald van de 3H-TdR opname in de tijd te volgen. Het monster voor de bepaling werd op het chlorofyl maximum genomen en geïnkubeerd op de temperatuur van het oppervlaktewater.

### Bepaling

1. Voeg aan 250 ml monster 3H-TdR toe tot een konsentrasie van 5 nM.
2. Inkubeer het monster 5 h bij de bovende de thermocline heersende temperatuur.
3. Neem na respectievelijk 0, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 en 300 min in duplo een submonster en volg verder de werkwijze zoals deze vermeld staat onder § 2.2 vanaf punt 4.

### 2.2.2 Konversiefaktor

Om de bakteriële produktie ( $\text{g C} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ ) te kunnen herleiden uit de bakteriële aktiviteit ( $\text{mol thymidine} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ ) moet de konversiefaktor ( $\text{g C} \cdot \text{mol}^{-1}$  thymidine) bepaald worden. Dit gebeurde

volgens de door Kirchman et al. (1982) beschreven methode. De toename van zowel het biovolume als de inbouw van  $^3\text{H}$ -thymidine werd in de tijd gevolgd. De konversie-faktor wordt gegeven door het kотиënt van de toename van de celdichtheid en de geïntegreerde  $^3\text{H}$ -thymidine inbouw.

#### Bepaling

1. Filtreer 450 ml monster over een  $0.2 \mu\text{m}$  cellulose acetaat filter.
2. Breng dit samen met 50 ml onbehandeld monster over in een uitgegloeide pyrexflles (5 h  $500^\circ\text{C}$ ).
3. Inkubeer het monster 48 h op de boven de thermocline heersende temperatuur.
4. Neem na respektievelijk 0, 8, 12, 24 en 48 h submonsters voor de bepaling van de aktiviteit (§ 2.2) en biomassa (§2.3).

#### 2.2.3 Tijdserie

Om een idee te krijgen van de dagelijkse ritmiek werd de bakteriële produktie gedurende de dag gemeten op respektievelijk  $47^\circ\text{N}$  en  $60^\circ\text{N}$ . Gedurende 24 h werd op de diepte van het chlorofyl maximum monsters genomen met de Niskin. Elk monster werd direkt verwerkt, zoals in § 2.1 - § 2.3 beschreven staat.

### 2.3 Bepaling bakteriële biomassa

De biomassa op een bepaalde diepte wordt gegeven door het produkt van het gemiddelde volume, de bakterie dichtheid en de konversiefaktor (biovolume  $\times$  biomassa) voor pelagische bakteriestammen,  $380 \text{ fg C} \cdot \mu\text{m}^{-3}$  (Lee & Fuhrman, 1987). De biomassa werd ook direkt aan de hand van de dichtheid bepaald. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de konversiefaktor (dichtheid  $\times$  biomassa)  $20 \text{ fg C} \cdot \text{cel}^{-1}$  (Lee & Fuhrman, 1987).

#### 2.3.1 Bakterie dichtheid

De dichtheid werd bepaald door middel van epifluorescentie mikroskopie. Bakteriën worden gekleurd met het DNA-specifieke fluorochroom Hoechst dye 33258 (Paul, 1982). Na affiltreren op een gezwart Nucleopore polycarbonaatfilter ( $0.2 \mu\text{m}$ , Hobbie et al., 1977) werd de dichtheid bepaald door in een kwadrant met bekend oppervlak het bakterie aantal te bepalen. De dichtheid wordt gegeven door:

$$\text{Bakteriedichtheid} = X * \frac{A_f}{A_k} * \frac{1000}{V_i} * \frac{V_m + V_f}{V_m} \quad (*l^{-1})$$

X aantal getelde bakteriën;  $A_f$  Netto oppervlakte filter;  $A_k$  Getelde oppervlak;  
 $V_i$  Inkubatie-volume;  $V_m$  Monstervolume en  $V_f$  Volume toegevoegd fixatief.

Per preparaat werden 20 velden met 25 tot 250 cellen geteld.

#### Reagentia

1. Hoechst dye 33258 0.5 mM in kunstmatig zeewater (Hoechst).
  2. Irgalan zwart oplossing: los 0.2 g irgalan zwart op in 100 ml dest met 2% ijsazijn.
  3. Mc Ilvaines buffer (pH 4.0): 12.9 g·l<sup>-1</sup> citroenzuur en 27.6 g·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O in kunstmatig zeewater (KZ).
  4. Kunstmatig zeewater (KZ):  
Hieraan werd gebufferde formyldehyde toegevoegd tot 2% om bederf te voorkomen.
- Alle reagentia zijn 0.2 µm gefiltreerd.

#### Bepaling

1. Inkubeer het te tellen monster 30 min in het donker met een Hoechst eindconcentratie van 10 µM en 1/6 deel buffer.
  2. Filtreer het monster onder laag vacuüm (0.2 bar) af op een gezwart nucleopore filter (0.2 µm).
  3. Zorg ervoor dat het filter geheel droog is en breng het dan over op een van immersieolie voorzien objektglas.
  4. Doe ook op het filter een druppel immersieolie en plaats er een dekglasje op. Het geheel moet min of meer doorzichtig zijn.
  5. Tel in duplo minstens 200 cellen per preparaat in 10 kwadranten (Zeiss standaard mikroskoop).
- Regelmatig werd een blanco telling uitgevoerd. Hierbij werd de bovengenoemde procedure gevolgd. In plaats van monster werd echter gesteriliseerd KZ geïnkubeerd.

#### 2.3.2 Biovolume

Het biovolume werd bepaald door met behulp van een oculair micrometer (0.488 µm) de dimensies  $d$  (= breedte) en  $l$  (= lengte) van de cellen op te meten en gebruik makend van de onderstaande formule voor het volume van een staaf met half-bolvormige uiteinde. Deze formule geldt zowel voor staven als voor kokken, omdat voor cocci geldt dat de lengte gelijk is aan de breedte ( $l-d=0$ ). De vergelijking voor het volume van een bol blijft dan over.

$$V = (d^2 * \frac{\pi}{4}) * (l-d) + \pi * \frac{d^3}{6}$$

Spirillen worden opgevat als gekromde staven. Er zijn 20 grootte klassen gemaakt waarover de 200 cellen die per preparaat geteld werden verdeeld worden. Hieruit werd het gemiddelde volume bepaald. De SD bedroeg ± 5% van de gemiddelde waarde.

## 3

RESULTATEN3.1 Bakteriële produktie3.1.1 Lineariteit

Op station #51 en #81 is de  $^3\text{H}$ -thymidine inbouw gedurende 5 h gemeten. De aktiviteit ( $\text{mol } ^3\text{H}\text{-Thymidine}\cdot\text{l}^{-1}$ ) staat in fig 3.1 en 3.2 logaritmisch uitgezet tegen de inkubatieuur.

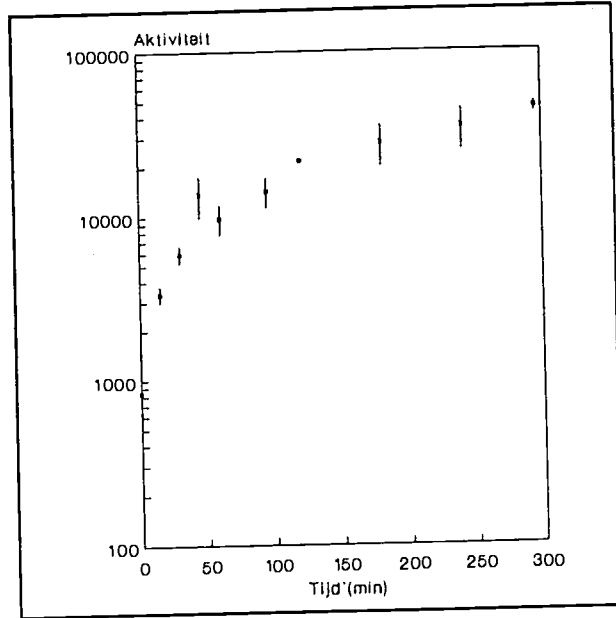


Fig 3.1 Lineariteit #51  
 $^3\text{H}$ -Thymidine-inbouw logaritmisch uitgezet tegen de tijd.

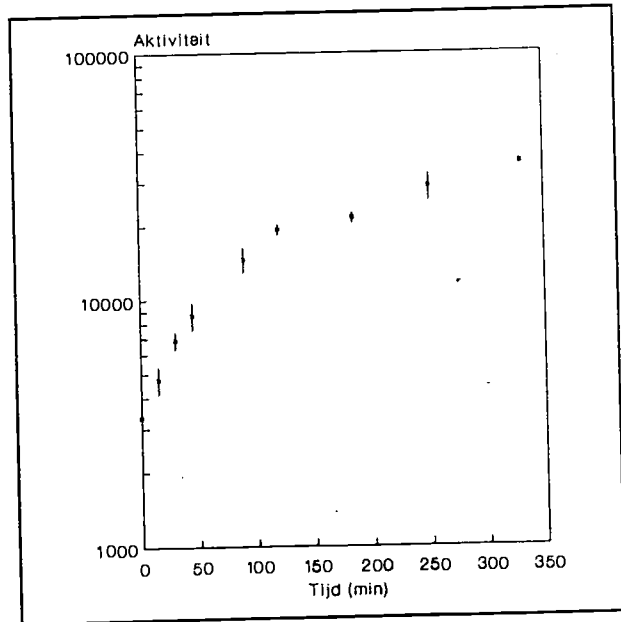


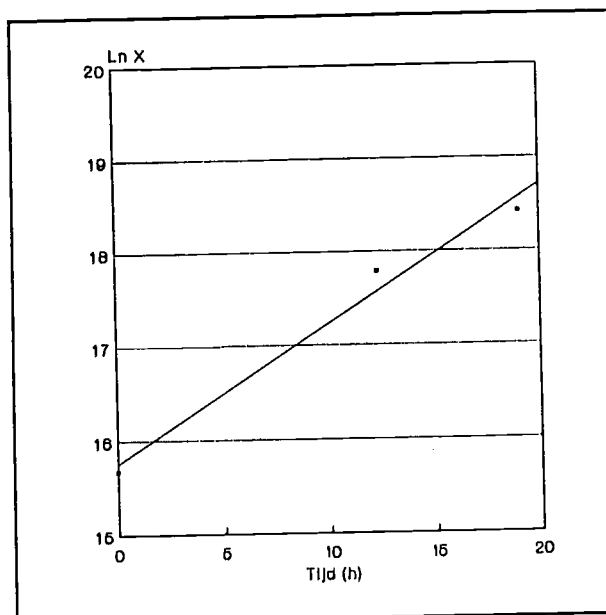
Fig 3.2 Lineariteit #81  
 $^3\text{H}$ -Thymidine-inbouw logaritmisch uitgezet tegen de tijd.

### 3.1.2 Konversiefactor (Kirchman et al., 1982)

Door het monster  $10^*$  te verdunnen werd de predatiedruk grotendeels opgeheven. De empirische konversiefactor (cellen  $\cdot$  mol $^{-1}$  thymidine) wordt gegeven door het kottiënt van de toename van de celdichtheid (cellen  $\cdot$  l $^{-1}$ ) en de geïntegreerde  $^3$ H-thymidine inbouw (mol thymidine  $\cdot$  l $^{-1}$ ). In fig 3.3 en 3.4 staan de toename van het biovolume en de de celdichtheid voor station #51 en #81 weergegeven. De monsters werden genomen op de diepte van het chlorofylmaximum. Voor station #51 en #81 was dit respectievelijk 11 m en 10 m. Inkubatie vond plaats op de oppervlaktewatertemperatuur respectievelijk 13°C en 10°C.

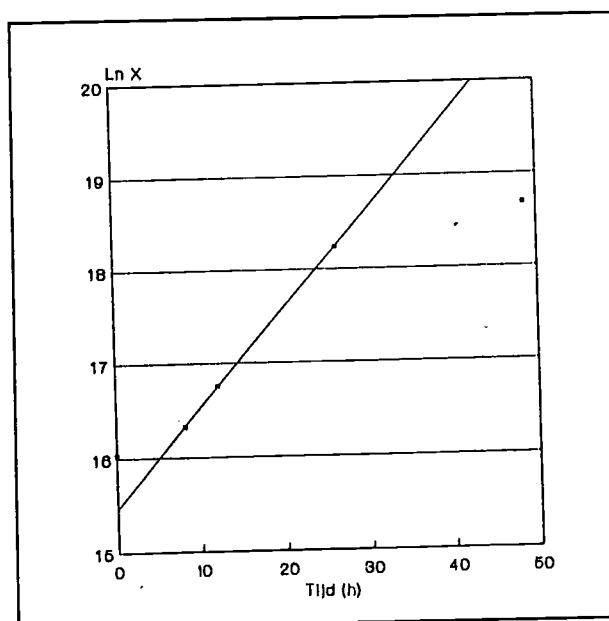
De konvesiefactor van station #51 bedraagt  $2.84 \cdot 10^{19}$  cellen  $\cdot$  mol $^{-1}$   $^3$ H-thymidine. Voor station #81 werd een konversiefactor van  $2.33 \cdot 10^{19}$  cellen  $\cdot$  mol $^{-1}$   $^3$ H-thymidine gevonden. Vergelijken met literatuurwaarden (§ 1.3.2) is de gevonden konversiefactor een faktor 10 te hoog.

Fig 3.3 Toename van het biovolume en de celdichtheid in de tijd voor station #51. De r.c. geeft het gewogen gemiddelde van de groeisnelheid van de gemengde populatie.



Wanneer de bakteriële produktie aan de hand van deze konversiefactor bepaald wordt blijkt de bakteriële produktie hoger te zijn dan de primaire produktie. Dat is in het onderzochte systeem, zonder allochtoon substraat, onmogelijk.

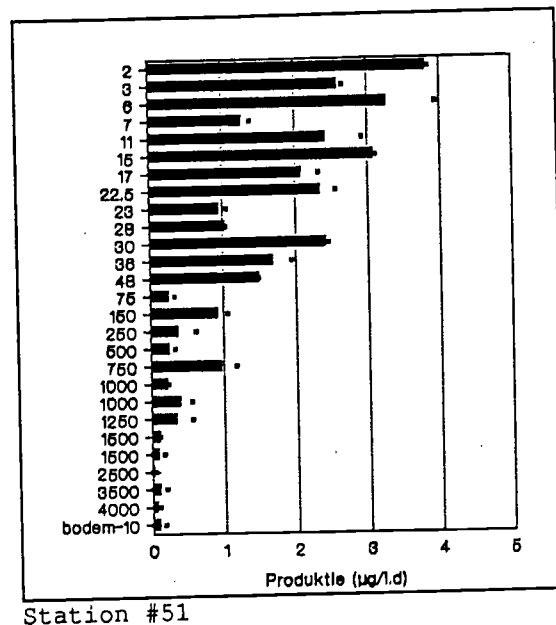
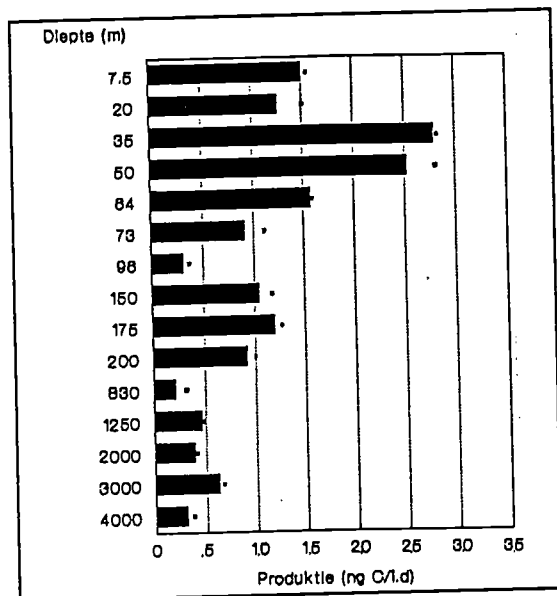
Fig 3.4 Toename van het biovolume en de celdichtheid in de tijd voor station #81. De r.c. geeft het gewogen gemiddelde van de groeisnelheid van de gemengde populatie.



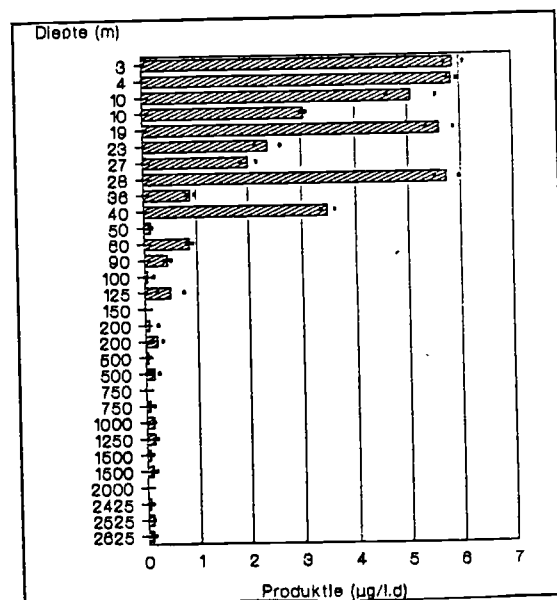
De bakteriële produktie werd dan ook berekend aan de hand van de konversiefaktor die op de JGOFS workshop in Kiel beschouwd werd als de beste benadering, namelijk  $2.0 \cdot 10^{18}$  cellen  $\cdot$  mol<sup>-1</sup> thymidine.

De bakteriële produktie

De bakteriële produktie ( $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) is grafisch uitgezet tegen de diepte (Fig 3.5).



Station #51



Station #81

Fig 3.5 Bakteriële produktie ( $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) met standaard deviatie uitgezet tegen de diepte (niet lineair). Berekend m.b.v. de konversiefactoren  $2 \cdot 10^{18}$  cellen  $\cdot$  mol<sup>-1</sup> thymidine en 20 fg C  $\cdot$  cel<sup>-1</sup> (Lee & Fuhrman, 1987).



3.1.3 Tijdserie

In fig 3.6 en 3.7 staat het verloop van de activiteit in de tijd aangegeven voor station #51 respektievelijk #81.

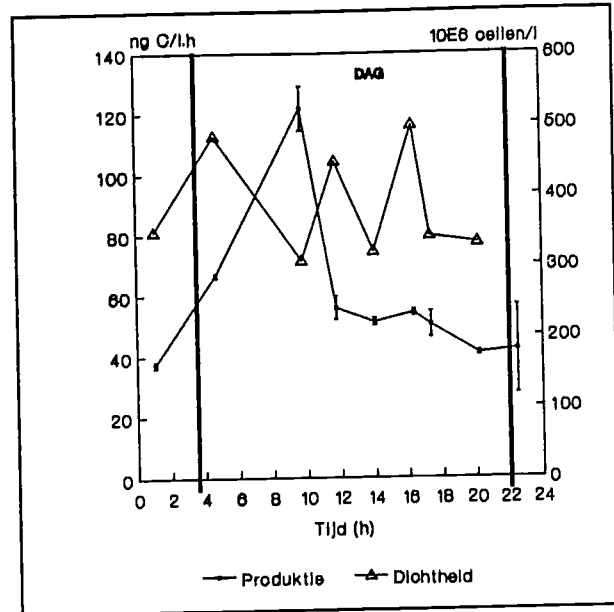


Fig 3.6 Ritmiek #51  
Bakteriële produktie ( $\mu\text{g C} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) en de celdichtheid ( $\cdot \text{l}^{-1}$ ) uitgezet tegen de tijd.

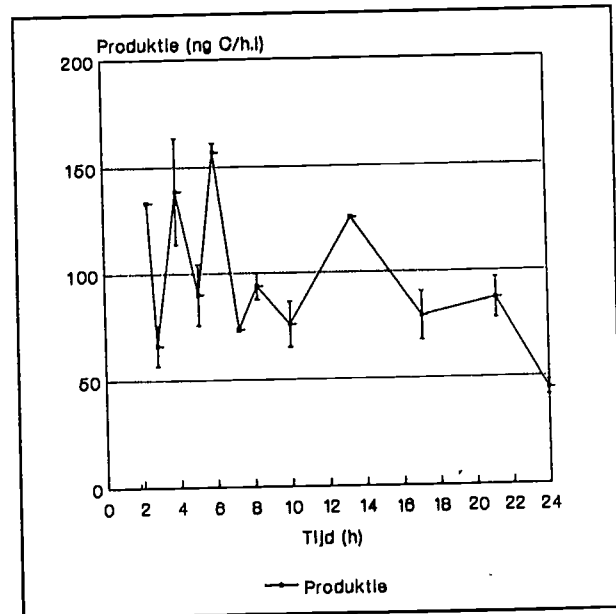


Fig 3.7 Ritmiek #81  
Bakteriële produktie ( $\mu\text{g C} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) uitgezet tegen de tijd.

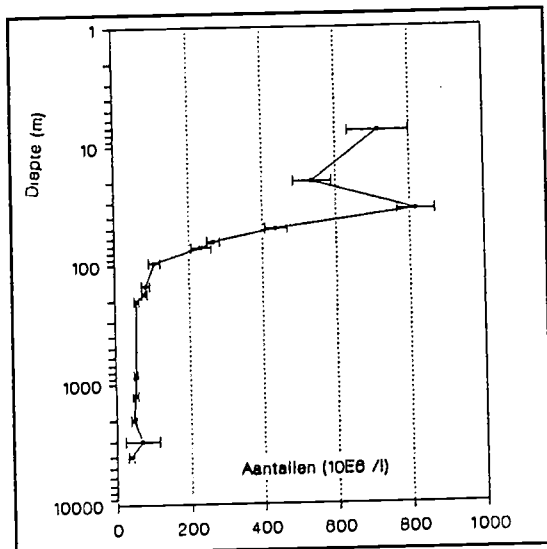
3.2 Bakteriële biomassa

De bakteriële biomassa is het produkt van de bakteriële dichtheid, het celvolume en de konversiefaktor van biovolume naar biomassa ( $20 \text{ fg C} \cdot \text{cel}^{-1}$  &  $380 \text{ fg C} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ , Lee & Fuhrman, 1987).

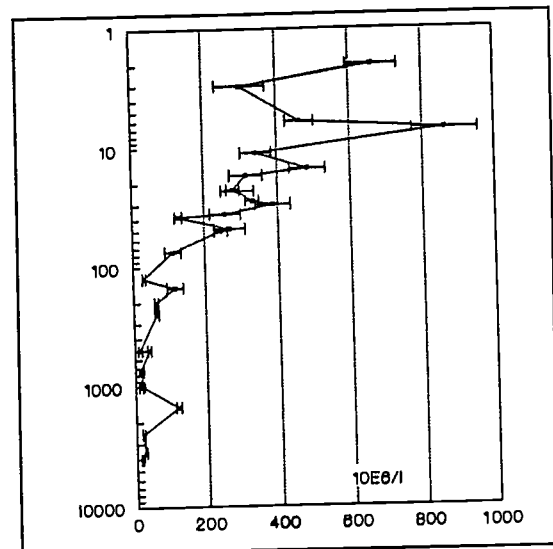
### 3.2.1 Bakterie dichtheid

De dichtheid werd bepaald door in 20 mikroskoopvelden 25 tot 250 cellen te tellen. Alleen cellen met een duidelijke begrenste herkenbare vorm en heldere fluorescentie werden geteld. Kontroles waarbij steriel kunstmatig zeewater werd bepaald gaven geen counts.

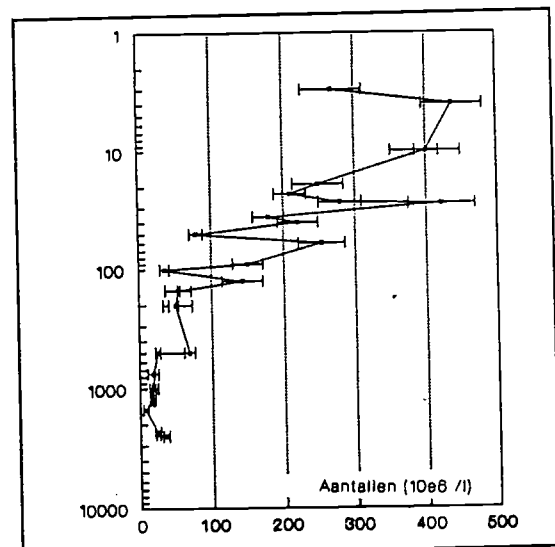
Door de lage dichtheden in de diepe monsters was tot 20 ml monster nodig, waardoor deze diepten slechts 2 maal geteld konden worden. De gevonden dichtheden (aantallen  $\cdot l^{-1}$ ) staan weergegeven in fig 3.8.



Station #30



Station #51



Station #81

Fig 3.8 Bakterie dichtheid.  
Cellen  $\cdot l^{-1}$  tegen de diepte (log m).

### 3.2.2 Biovolume

Het celvolume varieert sterk met de diepte. In de eufotische zone domineren  $0.061 \mu m^3$  grote kokken. In de diepte neemt het

percentage staven en spirillen toe. Door hun grote volume hebben spirillen een sterke invloed op het gemiddelde biovolume in de diepe monsters. In fig 3.9 is het gemiddelde volume per cel ( $\mu\text{m}^3$ ) voor de drie stations weergegeven in de diepte.

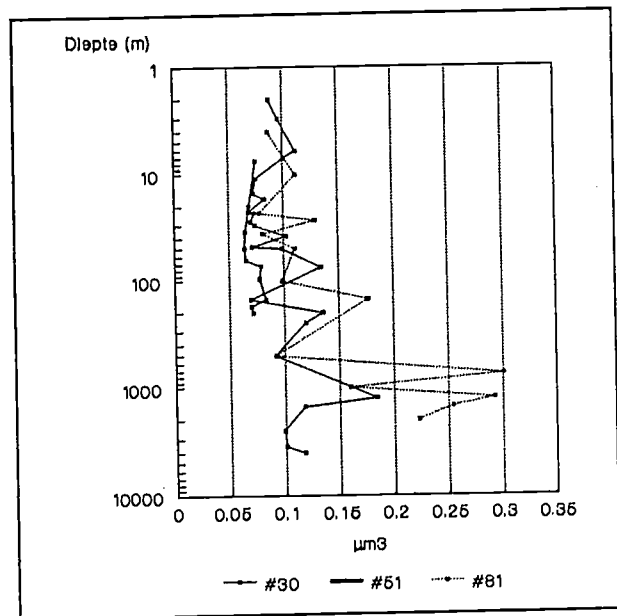


Fig 3.9 Verloop van het celvolume in de diepte (log m) voor de drie stations.

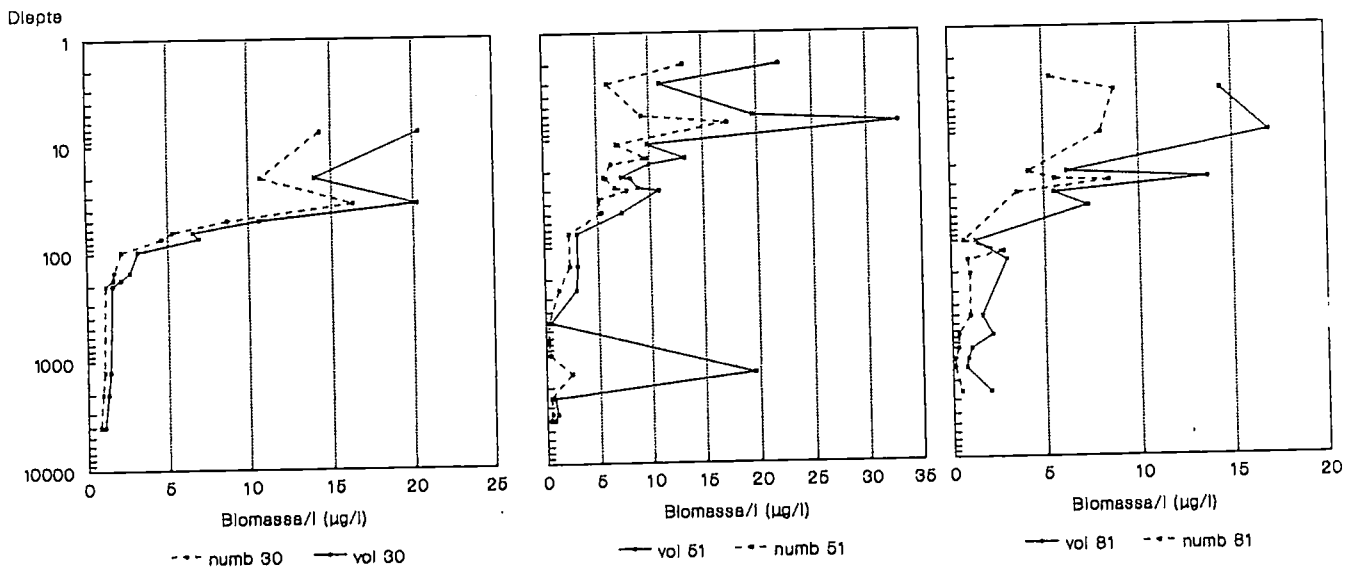


Fig 3.10 Verloop van de biomassa in de diepte (log m). De biomassa is berekent aan de hand van de 2 konversiefactoren,  $20 \text{ fg C} \cdot \text{cel}^{-1}$  en  $380 \text{ fg C} \cdot \mu\text{m}^{-3}$  (Lee & Fuhrman, 1987).

In fig 3.10 staat de biomassa tegen de diepte uitgezet. Voor de konversie naar biomassa werden de twee konversiefactoren van Lee & Fuhrman, 1987 gebruikt.

4

**DISKUSSIE**4.1 Bakteriële produktie

In de controle van station #51 en #81, op respectievelijk 47° en 60° noorderbreedte, bleek 5 nM Thymidine ( $82 \text{ Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ) slechts 60 minuten verzadigend te werken (fig 3.1 en 3.2). Dit zijn dan wel de monsters met de hoogste produktie. Toch is het raadzaam de inkubaties niet langer dan 60 minuten te laten duren of de konzentratie thymidine op te voeren.

De empirisch bepaalde konversiefactoren op station #51 en #81 zijn respectievelijk  $2.84 \cdot 10^{19}$  en  $2.33 \cdot 10^{19}$  cellen  $\cdot \text{mol}^{-1}$  thymidine. Deze waarden liggen een faktor 10 hoger dan de gebruikelijke konversiefactoren en de theoretisch bepaalde waarde,  $0.3 - 1.3 \cdot 10^{18}$  cellen  $\cdot \text{mol}^{-1}$  thymidine. Bovendien komt de bakteriële produktie hoger uit dan de primaire produktie wanneer met de bepaalde konversiefactoren doorgerekend wordt. Omdat er geen allochtone C-bronnen aanwezig zijn kan dat niet. De afwijkende konversiefactoren moeten derhalve opgevat worden als een artefact. Wat de oorzaak is van de lage inbouw van  $^3\text{H}$ -thymidine is niet duidelijk. Mogelijk wordt het isotoop door een deel van de populatie niet ingebouwd of gaat een deel tijdens extraktie verloren. Er is daarom gekozen voor de konversiefaktor, zoals die tijdens de JGOFS workshop in Kiel (maart 1990) gevonden werd. De daar aangenomen konversiefaktor had een waarde van  $2 \cdot 10^{18}$  cellen  $\cdot \text{mol}^{-1}$  thymidine.

De bakteriële produktie op de verschillende stations nam naar het noorden gaande toe. Op 33°N (station #30) was de produktie erg laag. De maximale bakteriële produktie bedroeg op 35 m diepte  $2.82 \text{ ng C} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Op 47°N en 60°N was de maximale produktie respectievelijk  $3.81 \text{ } \mu\text{g C} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  op 2m en  $5.89 \text{ } \mu\text{g C} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  op 3m. De gevonden bakteriële produktie op 47°N en 60°N komt sterk overeen met eerder gevonden waarden voor de open oceaan (Ducklow & Hill, 1985).

De lage primaire produktie kan niet de enige oorzaak zijn van de lage bakteriële produktie op station #30. Mogelijk groeide het bakterioplankton onder sterke N- of P-limitatie waardoor de respiratie ten opzichte van de assimilatie sterk toeneemt (§ 1.3) en de vorming van biomassa afneemt. Een tweede mogelijke oorzaak is dat het voedselweb een andere structuur heeft. Mogelijk speelt op station #30 van herbivoor zoöplankton een grotere rol in de opname van gefotosynthetiseerd materiaal. Hierdoor zou minder C beschikbaar zijn in de vorm van DOM (§ 1.3). In hoeverre de lage produktie veroorzaakt wordt door een artefact of wat de mogelijke achterliggende oorzaak is is helaas niet te achterhalen. Wanneer een respiratiekoëfficiënt van 50% wordt aangenomen (§ 1.3) is de C-opname door de mikrobiële populatie 2 maal zo groot als de bakteriële produktie. De maximale C-flow naar het bakterioplankton was op station #51 en station #81 dan respectievelijk  $7.6 \text{ } \mu\text{g C} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  en  $11.7 \text{ } \mu\text{g C} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ .

Wanneer in het pelagiaal de primaire en bakteriële produktie significant gekorreleerd zijn (Cole et al, 1988; Bjørnsen et al., 1989; §4.3) is het te verwachten dat naast de primaire produktie ook de bakteriële produktie een dagelijkse ritmiek vertoont, indirect onder invloed van het zonlicht. Hoewel het een eenmalige meting betrof (om praktische redenen kon helaas niet vaker naar de dagelijkse ritmiek gekeken worden) kon op station #51 een dagelijkse ritmiek in de bakteriële activiteit aangetoond worden. Onafhankelijk van de celdichtheden nam de activiteit na zonsopgang significant toe. De verhoogde activiteit nam in  $\pm 6$  h weer af tot het basale nivo. De produktie verdubbelde tijdens het maximum. Te verwachten is dat de verschillen in de primaire produktie veel extremer zijn. Zoals in "Materiaal & Methoden" vermeld staat is ieder monster op verschillende tijdstippen genomen. Hierbij bestaat het gevaar dat uit verschillende watermassa's werd gemonsterd. Het alternatief was dat uit één groot monster gedurende de dag submonsters voor inkubatie werden genomen. De laatste methode heeft echter als nadeel dat er een bottle-effect kan optreden. Daarom werd aan de eerstgenoemde methode de voorkeur gegeven. De kleine spreiding in de meetwaarde, het regelmatige verloop van de activiteit in de tijd onafhankelijk van de bacterie-aantallen en het feit dat de activiteit na 24 h weer op het zelfde nivo uit komt pleit voor de gemeten trend. Op station #81 was geen sprake van een dagelijkse ritmiek in de bakteriële activiteit. Het is hierbij van belang te weten dat eind mei op deze breedtegraad de nacht beperkt blijft tot een uur schemering. Dit zal tot gevolg hebben dat gedurende de dag het verschil in de primaire produktie minder extreem is, wat tot gevolg kan hebben dat de ritmiek in de bakteriële produktie achterwege blijft. De bakteriële produktie varieert over de dag namelijk slechts met een faktor 2, terwijl de primaire produktie vele malen sterker over de dag zal variëren. Een afvlakking in de primaire produktie kan dan tot gevolg hebben dat de variatie in de bakteriële produktie niet meer meetbaar is.

Zonlicht zou in het geval van een dagelijkse ritmiek het sturende mechanisme zijn. Om de hypothese dat bakteriële activiteit indirect door zonlicht gemedieerd wordt te bewijzen, zijn echter meer metingen noodzakelijk. Wanneer de bakteriële produktie inderdaad een significante ritmiek vertoont, is het voor een korrekte meting van de bakteriële activiteit nodig meerdere keren per dag deze activiteit te bepalen en niet slechts eenmaal zoals dat nu gebeurt.

#### 4.2 Bakteriële biomassa

De verschillen in de dichtheid en daarmee in de biomassa tussen de 3 stations waren gering. De dichtheid in de eufotische zone lag tussen de  $4 \cdot 10^8$  en  $8 \cdot 10^8$  cellen  $\cdot l^{-1}$ . Deze waarden komen sterk overeen met eerder gevonden waarden voor de open oceaan;  $1.4 \cdot 10^8$  cellen  $\cdot l^{-1}$  tot  $10 \cdot 10^8$  cellen  $\cdot l^{-1}$  (Ferguson &

Palumbo, 1979; Sieburth et al., ; Johnson & Sieburth, 1979). In de diepte nam de dichtheid af tot  $\pm 2 \cdot 10^7$  cellen $\cdot l^{-1}$  ( $5 \cdot 10^6$  cellen $\cdot l^{-1}$  tot  $3 \cdot 10^7$  cellen $\cdot l^{-1}$ ; Carlucci & Williams 1978; Azam et al., 1979). Wanneer naar de gehele waterfase wordt gekeken blijkt de ondergrens dus  $\pm 2 \cdot 10^7$  cellen $\cdot l^{-1}$  te zijn. Cho & Azam (1990) vonden hetzelfde fenomeen. Voor de eufotische zône van oligotrofe en eutrofe marine systemen vonden zij een ondergrens van  $\pm 10^8$  cellen $\cdot l^{-1}$ . Een mogelijke verklaring hiervoor is dat dit de minimale dichtheid is die voor predatie vereist is of dat onder deze dichtheid viruspropagatie bemoeilijkt wordt. Wanneer er van wordt uitgegaan dat een cel een vaste biomassa heeft ongeacht het volume ( $20 \text{ fg C} \cdot \text{cel}^{-1}$ ; Lee & Fuhrman, 1987), dan bedroeg de bakteriële biomassa in de eufotische zône  $8 \mu\text{g C} \cdot l^{-1}$  -  $16 \mu\text{g C} \cdot l^{-1}$ . Dit nam in de diepte af tot  $0.4 \mu\text{g} \cdot l^{-1}$ . Wanneer de biomassa bepaald wordt aan de hand van het biovolume ( $380 \text{ fg} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ ; Lee & Fuhrman, 1987) dan werd voor de eufotische zône een biomassa van  $10 \mu\text{g} \cdot l^{-1}$  -  $20 \mu\text{g} \cdot l^{-1}$  gevonden en  $0.99 \mu\text{g} \cdot l^{-1}$  voor de minimale waarde in de diepte. Ook deze waarden komen sterk overeen met wat anderen eerder vonden voor vergelijkbare systemen ( $2.5 \mu\text{g} \cdot l^{-1}$  -  $35.2 \mu\text{g} \cdot l^{-1}$ ; Azam et al., 1979; Sieburth et al., ; Landry et al., 1984; Holligan et al., 1984). Naar de bodem toe neemt het relatieve aantal spirillen toe. Zij beïnvloeden het gemiddelde celvolume sterk. Waarschijnlijk is voor hen de biomassabepaling op grond van het volume beter toepasbaar dan op grond van aantal. De minimale biomassa komt dan op  $0.99 \mu\text{g C} \cdot l^{-1}$ .

Op station #51 was op 7 m en 1500 m diepte de bakteriële biomassa respectievelijk  $33.0 \mu\text{g} \cdot l^{-1}$  en  $19.5 \mu\text{g} \cdot l^{-1}$ . Deze hoge biomassa vond niet zijn weerslag in een evenredig verhoogde activiteit. De hoge biomassa op 1500 m kan echter veroorzaakt zijn door organismen waarvan de produktie door de gebruikte methode niet gemeten wordt (Johnstone & Jones, 1989; Gilmour et al., 1990). Wanneer de organismen dan wel in staat zijn extern thymidine op te nemen is het goed mogelijk dat tijdens inkubatie de fysisch-chemische omstandigheden niet geschikt waren of dat door de bewerking van het monster de cellen geïnactiveerd werden. De methode is waarschijnlijk alleen geschikt voor het bepalen van de produktie van aerobe heterotrofe organismen. De produktie van andere organismen wordt helaas niet gemeten. Omdat vooral in de diepte naast aerobe heterotrofe organismen ook anaerobe heterotrofe mikro-organismen een minstens evengroot aandeel in de produktie kunnen hebben is het van belang technieken te ontwikkelen die deze organismen niet uitsluiten (Johnstone & Jones, 1989; Gilmour, 1990; Fallon & Newell, 1986).

#### 4.3 Korrelatie met de primaire produktie

De bakteriële produktie was sterk gekorreleerd met de primaire produktie (fig. 4.1). De primaire produktie ( $\mu\text{g C} \cdot l^{-1}$ ) werd tijdens JGOFS leg III door Gijs Kraay bepaald.

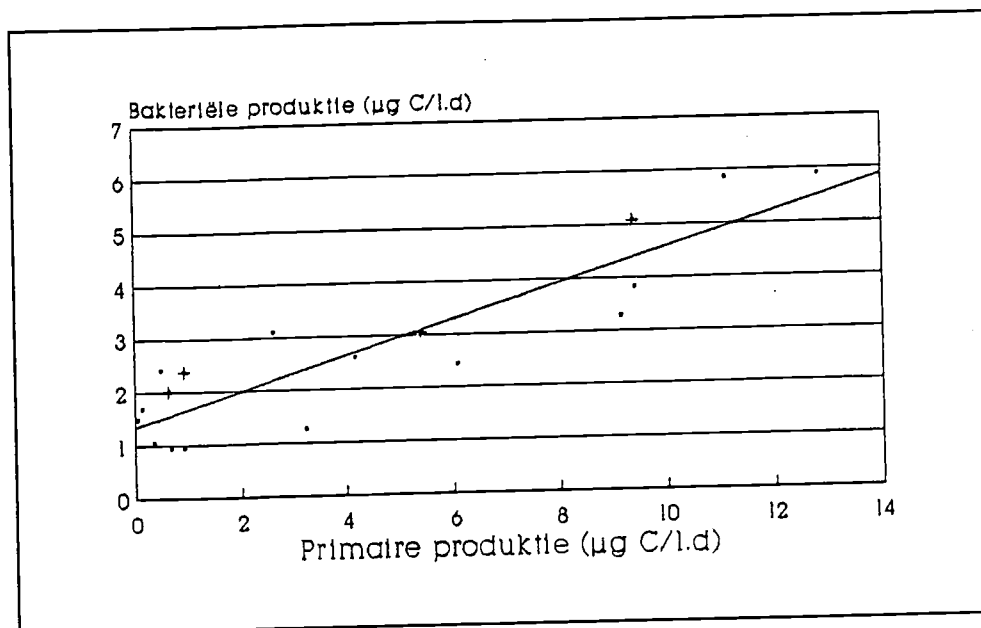


Fig 4.1  
Korrelatie  
tussen pri-  
maire en  
bakteriële  
produktie.

Wanneer een respiratiecoëfficiënt van 50% wordt aangenomen (§ 1.3) verloopt 50%-66% van de C-flow van het fytoplankton via de bacteriën (bakteriële prod./primaire prod.: fig. 4.1). Dit toont de invloed van de bacteriën op het systeem aan. Doordat bacteriën in staat zijn simultaan op veranderende milieufactoren, zoals veranderende substraatconcentraties, te reageren zal een direct verband ook tot uitdrukking kunnen komen. De dagelijkse ritmiek in de bakteriële produktie op station #51 geeft aan dat de link tussen de primaire produktie en de bakteriële produktie zeer nauw is. Uit de hoge korrelatie tussen de primaire en bakteriële produktie en de ritmiek waarmee het bakterioplankton op de primaire produktie reageert moet gekonkludeerd worden dat de bakteriële produktie direct onder invloed staat van de primaire produktie. Dit verloopt waarschijnlijk via het DOM. Een deel van de primaire produktie zal direct in het DOM terecht komen, waaruit het wordt opgenomen door het bakterioplankton. Wanneer het organische materiaal bijvoorbeeld via het herbivore zoöplankton beschikbaar zou komen is het uitgesloten dat 50%-66% van de primaire produktie in het bakterioplankton terecht komt, dat de korrelatie tussen de primaire produktie en de bakteriële produktie zo hoog zou zijn en dat er een dagelijkse ritmiek in de bakteriële produktie gevonden zou worden.

5

KONKLUSIES

De bacterie-dichtheid was over het gehele traject vrij konstant. In de oppervlaktelaag lag deze binnen de range  $4 \cdot 10^8$  tot  $8 \cdot 10^8$  cellen  $\cdot l^{-1}$ . De biomassa bedroeg 8 tot 16 C  $\mu g \cdot l^{-1}$ . De bacteriële biomassa had op de twee noordelijke stations een verdubbelingstijd van 1.1 tot 2.3 dagen.

In de gehele waterfase bedroeg de minimale dichtheid  $2 \cdot 10^7$  cellen  $\cdot l^{-1}$  of te wel 0.99  $\mu g C \cdot l^{-1}$ . De bacteriële dichtheid en daarmee biomassa blijkt binnen bepaalde grenzen konservatief te zijn. Meer onderzoek is nodig om te achterhalen of dit een algemeen geldend principe in het pelagiaal is en wat het achterliggende principe ervan is (Cho & Azam, 1990). Mogelijke oorzaken van homeostasis zijn de regulerende werking van predatoren en bacteriofagen die beide een minimale dichtheid nodig hebben beneden welke zij niet effectief zijn.

Het bacteriële produktiemaximum nam op het traject  $33^\circ N \rightarrow 47^\circ N \rightarrow 60^\circ N$  sterk toe en bedroeg respectievelijk 2.82 ng C  $\cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$  op 35 m diepte, 3.81  $\mu g C \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$  op 2 m diepte en 5.89  $\mu g C \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$  op 3 m diepte. Veel onderzoekers werken met een standaardkonversiefactor van thymidine (ingebouwd) naar cellen (gevormd). Helaas werd ook ik gedwongen om van deze konversiefactor gebruik te maken. Het is natuurlijk beter om ter plaatse de konversiefactor te bepalen, omdat deze varieert en het nog niet duidelijk is waardoor deze variatie wordt veroorzaakt. Er is dus meer onderzoek nodig naar de omstandigheden die de konversiefactor beïnvloeden.

De produktie was sterk gekorreleerd met de primaire produktie en het is dan ook niet verwonderlijk dat de bacteriële produktie, evenals de primaire produktie, een dagelijkse ritmiek vertoont. Hieruit kan worden gekonkludeerd dat de bacteriële produktie direkt onder invloed staat van de primaire produktie via het DOM. Omdat de bacteriële produktie over de dag varieert is het beter deze meerdere malen per dag te bepalen. Tot nu toe is er te weinig aandacht besteed aan de mogelijke ritmiek in de bacteriële produktie. Er is meer onderzoek aan deze ritmiek nodig om tot een juiste kwantifikatie te komen van de produktie. Er is aanvullend werk nodig om de relatie tussen de primaire produktie en de bacteriële produktie te achterhalen. Kontinu-kultuur-experimenten, waarbij zowel primaire producenten als bacterioplankton vertegenwoordigd zijn, moeten antwoord geven op de vraag wat de relaties tussen beide groepen zijn.

Wanneer een respiratiecoëfficiënt van 50% wordt aangenomen, verloopt  $\pm 60\%$  van de C-flux van de primaire producenten via het bacterioplankton. Hieruit volgt dat van de primaire produktie direkt 30% weer als  $CO_2$  vrijkomt en dat 30% ingebouwd wordt in het bacterioplankton. De overige 40% komt ten goede aan herbivoren of sedimenteert. Er vindt dus een snelle turnover plaats van het fotosynthetisch gefixeerde materiaal. Het is nog onduidelijk wat er de oorzaak van is dat  $\pm 60\%$  van de primaire produktie in het DOM terecht komt. Fagen, exkretie door het fytoplankton en sloppy-feeding van het zoöplankton



zullen hierbij een rol spelen. Er is meer onderzoek nodig naar het kwantitatieve belang van de genoemde bronnen. Voor een beter inzicht in de bakteriële produktie, ook in de diepere watermassa's, is het nodig dat er een methode komt die geen funktionele groepen uitsluit, zoals dat nu gebeurt. Chemolithotrofe en sulfaat-reducerende bakteriën worden met deze methode gemist omdat zij geen extra-cellulair thymidine inbouwen (Johnstone & Jones, 1989; Gilmour, 1990; Fallon & Newell, 1986).

## LITERATUURLIJST

- Abrams, B.I.** and M.J. Mitchell (1980) role of nematode-bacterial interactions in heterotrophic systems with emphasis on sewage sludge decomposition. *Oikos* 35:404-410
- Azam, F.** and B.C. Cho (1987) Bacterial utilization of organic matter in the sea. In *Ecology of microbial communities*. Cambridge University Press, Cambridge, 261-281
- Azam, F.,** T. Fenchel, J.G. Field, J.S. Gray, L.A. Meyer-Reil and T.F. Thingstad (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10:257-263
- Bell, R.T.** (1990) An explanation for the variability in the conversion factor deriving bacterial cell production from incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine. *Limnol. Oceanogr.* 35(4): 910-915
- Bjørnsen, P.K.** (1986) Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. *Appl. Environm. Microbiol.* 51:1199-1204
- Bjørnsen, P.K.,** B. Riemann, J. Pock-Steen, T.G. Nielsen and S.J. Horsted (1989) Regulation of bacterioplankton Production and Cell Volume in a Eutrophic Estuary. *Appl. Environm. Microbiol.* 55:1512-1518
- Bratbak, G.** (1985) Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl. Environm. Microbiol.* 49:1488-1493
- Bryan, J.R.,** J.P. Riley and P.J.L. Williams (1976) A Winkler procedure for making precise measurements of oxygen concentration for productivity and related studies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 21:191-197
- Burnison, B.K.** and D.J. Nuttley (1990) Purification of DNA for Bacterial Productivity Estimates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:362-365
- Burns, R.G.** (1980) Microbial adhesion to soil surfaces: consequences for growth and enzyme activities. In: *Microbial Adhesion to Surfaces* (R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent, eds.), pp.249-262, Ellis Horwood, Chichester
- Cho, B.C.** and F. Azam (1990) Biogeochemical significance of bacterial biomass in the ocean's euphotic zone. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 63:253-259
- Cole, J.J.,** S. Findlay and M.L. Pace (1988) Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: A cross-system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 42:1-10
- Coleman, A.W.** (1980) Enhanced detection of bacteria in natural environments by fluorochrome staining of DNA. *Limnol. Oceanogr.* 25(5):948-951
- Conveney, M.F.** and R.G. Wetzel (1988) Experimental Evaluation of Conversion Factors for the [<sup>3</sup>H]Thymidine Incorporation Assay of Bacterial Secondary Productivity. *Appl. Environm. Microbiol.* 54:2018-2026
- Copping, A.E.** and C.J. Lorenzen (1980) Carbon budget of a marine phytoplankton-herbivore system with <sup>14</sup>C as a tracer. *Limnol. Oceanogr.* 25:873-882

- Corpe, W.A.** (1974) Periphytic marine bacteria and the formation of microbial films on solid surfaces. In: Effect of the Ocean Environment on Microbial Activities (R.R. Colwell and R.Y. Morita, eds.), pp.397-417, University Park Press, Baltimore
- Corpe, W.A.** and H. Winters (1972) Hydrolytic enzymes of some periphytic marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 18:1483-1490
- Coveney, M.F.** and R.G. Wetzels (1988) Experimental evaluation of conversion factors for the [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay of bacterial secondary productivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2018-2026
- Darnell, R.M.** and D.C. White (1967) Organic detritus in relation to the estuarine ecosystem. In: Estuaries (G.H. Lauff, ed.), pp.376-382, Publ. A.A.A.S. no.83, Washington D.C.
- Davis, W.M.** and D.C. White (1980) Fluorometric determinations of adenosine nucleotide derivatives as measures of the microfouling, detrital and sedimentary microbial biomass and physiological status. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:539-548
- De Man, J.C.** (1975) The probability of most probable numbers. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 1:67-78
- Ducklow, H.W.** and S.M. Hill (1985) The growth of heterotrophic bacteria in the surface waters of warm core rings. *Limnol. Oceanogr.* 30:239-259
- Ducklow, H.W.,** D.A. Purdie, LeB P.J. Williams and J.M. Davies (1986) Bacterioplankton a sink for carbon in a coastal marine plankton community. *Science* 232:865-867
- Fallon, R.** and S.Newell (1986) Thymidine incorporation by the community of standig dead *spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:1206-1208
- Fenchel, T.** and P. Harrison (1976) The significance of bacterial grazing and mineral cycling for the decomposition of particulate detritus. In: The Role of Terrestrial and Aquatic Organisms in Decomposition Processes (J.M. Anderson and A. MacFadyan, eds.) pp.285-299, Blackwell, Oxford
- Francisco, D.E.,** R.A. Mah and A.C. Rabin (1973) Acridine-orange-epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 92:416-421
- Fuhrman, J.F.** (1981) Influence of method on the apparent size distribution of bacterioplankton cells: epifluorescence microscopy compared to scanning electron microscopy. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 5:103-106
- Fuhrman, J.A.,** and F. Azam (1980) Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antartica and California. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:1085-1095
- Fuhrman, J.A.,** and F. Azam (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: Evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66:109-120
- Gilmour, C.C.,** M.E. Leavitt and M.P. Shiaris (1990) Evidence against incorporation of exogenous thymidine by sulfate-reducing bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 35(6):1401-1409
- Grivell, A.R.** and J.F. Jackson (1968) Thymidine kinase: Evidence for its absence from *neurospora crassa* and some other micro-organisms, and the relevance of this to the specific labelling of deoxyribonucleic acid. *J. Gen. Microbiol.* 54:307-317

- Hagström, A.**, F. Azam, A. Andersson, J. Wikner and F. Rassoulzadegan (1988) Microbial loop in an oligotrophic pelagic marine ecosystem: possible roles of cyanobacteria and nanoflagellates in the organic fluxes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 49:171-178
- Hagström, A.**, U. Larsson, P. Hörstedt, and S. Normark (1979) Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:805-812
- Hamilton, R.D.** (1973) Interrelationships between bacteria and protozoa. In: *Estuarine Microbial Ecology* (L.H. Stevenson and R.R. Colwell, eds.) pp.491-497, Univ. South Carolina Press, Columbia
- Hobbie, J.E.**, O. Holm-Hansen, T.T. Packard, L.R. Pomeroy, R.W. Sheldon, J.P. Thomas and W.J. Wiebe (1972) A study of the distribution and activity of microorganisms in ocean water. *Limnol. Oceanogr.* 17:544-555
- Hobbie, J.E.**, R.J. Daley and S. Jasper (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1225-1228
- Hollibaugh, J.T.**, A.B. Carruthers, J.A. Fuhrman and F. Azam (1980) Cycling of organic nitrogen in marine plankton communities studied in enclosed water columns. *Mar. Biol.* 59:15-21
- Holm-Hansen, O.**, T.T. Packard and L.R. Pomeroy (1970) Efficiency of the reverse-flow filter technique for concentration of particulate matter. *Limnol. Oceanogr.* 15:832-834
- Holm-Hansen, O.** (1973) The use of ATP determinations in ecological studies. *Bull. Ecol. Res. Comm. (Stockholm)* 17:215-222
- Jeffrey, W.H.** and J.H. Paul (1988) Underestimation of DNA Synthesis by [<sup>3</sup>H]Thymidine Incorporation in Marine Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:3165-3168
- Johnstone, B.H.** and R.D. Jones (1989) A Study on the Lack of [Methyl-<sup>3</sup>H]Thymidine Uptake and Incorporation by Chemolithotrophic Bacteria. *Microb. Ecol* 18:73-77
- Jonas, R.B.**, J.H. Tuttle, D.L. Stoner and H.W. Ducklow (1988) Dual-label radioisotope method for simultaneously measuring bacterial production and metabolism in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:791-798
- Jones, J.G.** and B.M. Simon (1975) An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method for dyeing membrane filters. *J. Appl. Bact.* 39:317-329
- Jordan, M.J.** and G.E. Likens (1980) Measurement of planktonic bacterial production in an oligotrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 25:719-732
- Karl, D.M.** (1979) Measurement of microbial activity and growth in the ocean by rates of stable ribonucleic acid synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:850-860
- Karl, D.M.** (1980) Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* 44:739-796
- Karl, D.M.** (1981) Simultaneous rates of RNA and DNA synthesis for estimating growth and cell division of aquatic microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:802-810

- Kim, J.** and C.E. ZoBell (1974) Occurrence and activities of cellfree enzymes in oceanic environments. In: Effect of the Ocean Environment on Microbial Activities (R.R. Colwell, and R.Y. Morita, eds.), pp.368-385, Univ. Park Press, Baltimore
- Kirchman, D.L.**, H. Ducklow and R. Mitchell (1982) Estimates of Bacterial growth from changes in uptake rates and biomass. *Appl. Environm. Microbiol.* 44:1296-1307
- Kirchman, D.L.**, E. K'Neas and R.E. Hodson (1985) Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl. Environm. Microbiol.* 49:599-607
- Kornberg, H.L.** (1966) Anaplerotic sequences and their role in metabolism. In: Essays in Biochemistry, Vol. 2, (P.N. Campbell, and G.D. Greville, eds.), pp.1-31, Academic Press, London
- Lampert, W.** (1978) Release of dissolved organic carbon by grazing zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* 23:831-834
- Larsson, U.** and A. Hagström (1979) Phytoplankton exudate release as an energy source for the growth of pelagic bacteria. *Mar. Biol.* 52:199-206
- Larsson, U.** and A. Hagström (1982) Fractionated phytoplankton primary production, exudate release, and bacterial production in an balthic eutrophication gradient. *Mar. Biol.* 67:57-70
- Laws, E.A.**, D.G. Redalje, L.W. Haas, P.K. Bienfang, R.W. Eppley, W.G. Harrison, D.M. Karl and J. Marra (1984) High phytoplankton growth rates oligotrophic Hawaiian coastal waters. *Limnol. Oceanogr.* 29(6):1161-1169
- Lee, S.** and J.A. Fuhrman (1987) Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1298-1303
- Maaloe, O.** and N.O. Kjeldgaard (1966) Control of Macromolecular Synthesis: A Study of DNA, RNA and Protein Synthesis in Bacteria. W.A. Benjamin, New York
- Matin, A.** and H. Veldkamp (1978) Physiological basis of the selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. *J. Gen. Microbiol.* 105:187-197
- Meyer-Reil, L.-A.** (1977) Bacterial growth rates and biomass production. In: Microbial Ecology of a Brackish Water Environment (G. Rheinheimer, ed.) pp.223-235. Springer-Verlag, Berlin
- Meyer-Reil, L.-A.** (1981) Enzymatic decomposition of proteins and carbohydrates in marine sediments: methodology and field observations during spring. *Kieler Meeresforsch Sonderh.* 5:311-317
- Moriarty, D.J.W.** and P.C. Pollard (1981) DNA synthesis as a measure of bacterial productivity in seagrass sediments. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 5:151-156
- Moriarty, D.J.W.** and P.C. Pollard (1990) Effects of radioactive labelling of macromolecules, disturbance of bacteria and adsorption of thymidine to sediment on the determination of bacterial growth rates in sediment with tritiated thymidine. *J. Microbiol. Methods* 11:127-139
- Ogura, N.** (1972) Rate and extent of decomposition of dissolved organic matter in surface seawater. *Mar. Biol.* 13:89-93

- Palumbo, A.V.,** R.L. Ferguson and P.A. Rublee (1984) Size of suspended bacterial cells and association of heterotrophic activity with size fractions of particles in estuarine and coastal waters. *Appl. Environm. Microbiol.* 48:157-164
- Paul, J.H.** (1982) Use of Hoechst Dyes 33258 and 33342 for Enumeration of Attached and Planktonic Bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* 43:939-944
- Pirt, S.J.** (1985) Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford etc.
- Pomeroy, L.R.** and R.E. Johannes (1968) Occurrence and respiration of ultraplankton in the upper 500 metres of the ocean. *Deep Sea Res.* 15:381-391
- Porter, K.G.** and Y.S. Feig (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25(5):943-948
- Riemann, B.,** J. Fuhrman and F. Azam (1982) Bacterial secondary production in freshwater measured by the 3H-thymidine incorporation method. *Microb. Ecol.* 8:101-114
- Riemann, B.,** N.O.G. Jørgensen, W. Lampert and J.A. Fuhrman (1986) Zooplankton induced changes in dissolved free amino acids and in production rates of freshwater bacteria. *Microb. Ecol.* 12:247-258
- Riemann, B.,** P.K. Bjørnsen, S. Newell and R. Fallon (1987) Calculation of cell production of coastal marine bacteria based on measured incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine. *Limnol. Oceanogr.* 32(2):471-476
- Riemann, B.,** T.B. Russell, N.O.G. Jørgensen (1990) Incorporation of thymidine, adenine and leucine into natural bacterial assemblages. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 65:87-94
- Robarts, R.D.** and R.J. Wicks (1989) [Methyl-3H]thymidine macromolecular incorporation and lipid labeling: Their significance to DNA labeling during measurements of aquatic bacterial growth rate. *Limnol. Oceanogr.* 24(1):213-222
- Romanenko, V.I.** (1964) Heterotrophic assimilation of CO<sub>2</sub> by bacterial flora of water. *Microbiology* 33:610-614
- Seki, H.** (1972) The role of microorganisms in the marine food chain with reference to organic aggregates. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 29:245-259
- Simon, M.** and F. Azam (1989) Protein content and protein synthesis of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 51:201-213
- Sorokin, Y.I.** (1964) On the trophic role of chemosynthesis in water bodies. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* 49:307-324
- Sorokin, Y.I.** (1971) On the role of the bacteria in the productivity of tropical oceanic waters. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* 56:1-48
- Sorokin, Y.I.** and H. Kadota (1972) Techniques for the assessment of microbial production and decomposition in fresh waters. *Int. Biol. Progr. No.23*, Blackwell, Oxford
- Steele, J.H.** (1974) The Structure of Marine Ecosystems. Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.
- Suttle, C.A.,** A.M. Chan and M.T. Cottrell (1991) Use of ultrafiltration to isolate viruses from seawater which are pathogens of marine phytoplankton. *Appl. Environm. Microbiol.* 57:721-726
- Thingstad, T.F.** (1987) The Microbial Loop (thesis). University of Bergen, Norway

**Turley, C.M.** and K. Lochte (1986) Diel changes in the specific growth rate and mean cell volume of natural bacterial communities in two different water masses in the Irish Sea. *Microb. Biol. Ecol.* 12:271-282

**Van Es, F. B.** and L.A. Meyer-Reil (1982) Biomass and Metabolic Activity of Heterotrophic Marine Bacteria. In: *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 6 (K.C. Marshall, ed), Plenum Press, New York, London

**Wicks, R.J.** and R.D. Roberts (1987) The extraction and purification of DNA labelled with [methyl-3H]thymidine in aquatic bacterial production studies. *J. Plankt. Res.* 9:1159-1166

**Wiebe, W.J.** and L.R. Pomeroy (1972) Microorganisms and their association with aggregates and detritus in the sea: a microscopic study. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 29:325-352

**Williams, P.J. LeB.** (1981) Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of the planktonic food web. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* 5:1-28

**Zsolnay, A.** (1975) Total labile carbon in the euphotic zone of the Baltic Sea as measured by BOD. *Mar. Biol.* 29:125-128

---

Bijlage I Uitkomsten getabelleerd  
II Primaire produktie



Station ID

070570

Diepte	Dpm	duplo	Dpm	duplo	i. vol.	i. duur	rel. akt.
7.5	304.3	258.3	1350.4	1437.7	10	90	106910
20	354.9	423.1	1137.8	1502.5	10	90	74880
35	358.9	396.2	2412.1	2468.6	10	90	203455
50	379.6	305.2	2418.1	2002	10	90	207570
64	351.5	343.1	1519.7	1494.9	10	90	117240
73	272.4	608.2	971.3	1259.1	10	90	53100
96	435.8	515.5	655.3	743.8	10	90	17965
150	245.4	215.4	1096.8	911.8	10	90	86640
175	77.6	80.8	1015.8	913.8	10	90	93680
200	301.7	266.4	901.2	1021.1	10	90	61715
530	821.6	824.6	1619.2	1074.8	40	105	19902.5
1250	538.6	448.1	1624.6	1681.1	40	105	25281.25
2000	452.2	521.1	1522.6	1397.6	40	105	25295.75
3000	752.8	513.4	2085.2	2326.4	40	105	34302.5
4000	1008	995.2	1931.3	1612.7	40	105	23242.5

duplo	mol T/l	duplo	k.f.	gem. vol.	x0 (n.ml)	x0 (µm3.l)	MFC.l	val
114640	5.8E-13	6.2E-13	2.0E+18	0.0748	715115.2	53490691	20.73646	
111350	4.0E-13	6.0E-13	2.0E+18	0.0685	536012.7	36716869	13.9524	
209105	1.1E-12	1.1E-12	2.0E+18	0.0651	516637	53163068	20.20196	
165960	1.1E-12	9.0E-13	2.0E+18	0.0642	434481.9	28022137	10.64841	
114760	6.3E-13	6.2E-13	2.0E+18	0.0654	265078.9	17336160	6.587740	
81680	2.9E-13	4.4E-13	2.0E+18	0.0792	231969.3	18371968	6.981348	
26815	9.7E-14	1.4E-13	2.0E+18	0.0776	107000.6	8303246	3.155233	
68140	4.7E-13	3.7E-13	2.0E+18	0.0635	82774.09	6911636	2.626421	
93460	5.1E-13	4.5E-13	2.0E+18	0.0699	79442.93	5553060	2.110163	
73705	3.3E-13	4.0E-13	2.0E+18	0.0716	57235.25	4098043	1.557256	
6292.5	1.1E-13	3.4E-14	2.0E+18	0.0716	53298.43	3816167	1.450143	
29693.75	1.5E-13	1.6E-13	2.0E+18	0.0716	51077.67	3657161	1.389721	
22773.75	1.4E-13	1.2E-13	2.0E+18	0.0716	45828.58	3281326	1.246904	
42332.5	2.0E-13	2.3E-13	2.0E+18	0.0716	69142.64	4750879	1.83124	
15277.5	1.3E-13	8.3E-14	2.0E+18	0.0716	38156.83	2732029	1.038171	

FUND	name/line	rate	rate	name/line	rate	rate
14.70232	72236.48	0.001444	0.001454	77459.45	0.001342	0.001357
10.75025	50594.59	0.001011	0.001253	72236.48	0.001504	0.001514
12.33274	137469.5	0.002749	0.002727	141227.1	0.002523	0.002532
8.727535	140250	0.002802	0.002325	112135.1	0.002242	0.002249
5.701575	75216.21	0.001564	0.001567	77540.54	0.001530	0.001531
4.859336	35873.37	0.000717	0.000912	55324.32	0.001106	0.000849
2.140012	12138.51	0.000242	0.000302	18112.24	0.000362	0.000331
1.655481	58540.54	0.001170	0.001045	46040.54	0.000920	0.000851
1.568858	63283.78	0.001265	0.001196	56391.89	0.001127	0.000813
1.144705	41699.32	0.000833	0.000915	45800.67	0.000996	0.000827
1.065968	15682.90	0.000313	0.000206	4960.304	0.000099	0.000054

1.021553	22293.77	0.000445	0.000457	23407.33	0.000468	0.000124
0.916571	20415.68	0.000408	0.000383	17952.28	0.000359	0.000116
1.382932	28616.83	0.000572	0.000619	33370.21	0.000667	0.000125
0.763136	18321.79	0.000366	0.000303	12043.07	0.000240	0.000111

Station 51 47N 20W

	diecta	DFMO	DFM	duplo	Ink vol.	Ink dur	rel. sk.
51.24	1	2632.65	12611.6	18925.7	10	132	1557915
51.16	3	2963.4	12024.7	12536.2	10	112	706171
51.24	6	2095.2	13050.8	16800.7	10	132	1095511
51.16	7	1816.2	6791.5	5952.5	10	112	457311
51.24	11	2844.4	15227.7	10956.4	10	132	1138330
51.16	15	2317.9	13506.6	13258.4	10	112	1115870
51.24	17	1586.65	11419.7	9374.6	10	132	983308
51.16	22.5	1666.2	9286	10836.7	10	112	761950
51.24	23	1778.05	6233.4	5332.5	10	132	445535
51.24	28	2826.7	7236.8	7122	10	132	441010
51.16	30	2058.7	10873	10582.7	10	112	881430
51.16	36	2445.9	9416.1	7546.8	10	112	697021
51.16	48	2577	7917.8	7917.8	10	112	534080
51.16	75	2488.2	3688.5	3034.1	10	112	120030
51.16	150	1461.5	4224	5260.3	10	112	276250
51.10	250	1758.4	2293.1	4441.9	20	67	25235
51.10	500	2708.7	4142.2	3409.6	20	67	71675
51.10	750	2637.7	7674.7	5876.1	20	67	251850
51.36	1000	1108	2654.6	2947.9	20	120	77331
51.10	1000	1781	2814	4156.9	20	67	51650
51.10	1250	1634.2	4054	2150.4	20	67	120990
51.36	1500	2469.5	3223.7	3285.1	20	120	37717
51.10	1500	1937.8	1074.7	2654.4	20	67	
51.20	2500	2233.6	2208.8	2423.1	20	80	
51.20	3500	1616.7	1563.8	2624.6	20	80	
51.20	4000	1435.3	1937.1	1218.4	20	80	25090
51.20	bottom-10	1900.9	2503.2	511.7	20	20	42112

duplo	mol t/l	duplo	x.f	gem. vol.	x0(x/ml)	x0(FrD/l)	Pa.1
1629305	8.6E-12	8.8E-12	2.0E+18	0.087624	641688	57970748	11.08237
957260	4.9E-12	5.2E-12	2.0E+18	0.095372	302327.3	28984722	11.01417
1670550	5.9E-12	9.0E-12	2.0E+18	0.111604	462828.3	51632489	11.62812
414030	2.7E-12	2.2E-12	2.0E+18	0.100569	863071.3	84798217	12.78212
911200	6.7E-12	4.4E-12	2.0E+18	0.07485	343209.6	25685232	7.761910
1094050	6.0E-12	5.9E-12	2.0E+18	0.072532	483017.1	35024196	11.31297
778795	5.7E-12	4.2E-12	2.0E+18	0.08297	315954.7	26214751	9.561235

717050	4.1E-12	5.0E-12	2.0E+18	0.068214	278614.8	18072250	7.247887
355445	2.4E-12	1.9E-12	2.0E+18	0.073839	291728.1	21482568	8.163374
429530	2.4E-12	2.3E-12	2.0E+18	0.069892	331903.9	23197427	8.315022
252400	4.8E-12	4.8E-12	2.0E+18	0.07365	387625	28348581	10.24846
510090	3.5E-12	2.8E-12	2.0E+18		257407.2		0
534080	2.9E-12	2.9E-12	2.0E+18	0.071419	242311	19178787	7.237179
54590	6.5E-13	3.0E-13	2.0E+18	0.07145	112047.3	8103813.	3.042209
379880	1.5E-12	2.1E-12	2.0E+18	0.069527	116085.6	8071083.	3.067011
132675	1.4E-13	7.2E-13	2.0E+18	0.119409	64301.33	7678187.	2.917699
35045	3.9E-13	1.9E-13	2.0E+18	0.091648	15444.43	1415451.	0.537871
161920	1.4E-12	8.8E-13	2.0E+18		14031.21		0
91995	4.2E-13	5.0E-13	2.5E+19		16251.98		0
118795	2.8E-13	6.4E-13	2.5E+19		23015.23		0
25810	6.5E-13	1.4E-13	2.5E+19	0.184199			0
40780	2.0E-13	2.2E-13	2.5E+19	0.429504	119719.6	51420047	19.53961
35830		1.9E-13	2.5E+19	0.117896	119719.6	14114461	5.363495
9475		5.1E-14	2.5E+19	0.09891	20592.57	2036811.	0.773988
50395		2.7E-13	2.5E+19	0.100848	26346.38	2656979.	1.009652
4155	1.4E-13	2.2E-14	2.5E+19	0.117415	16151.04	1896374.	0.720622
	2.4E-13		2.5E+19	0.113892	0	0	0

13.23376	1.9E+08	3.769037	1.9E+08	3.843078	3.506057		0.063644
6.046546	1.3E+08	2.516971	1.3E+08	2.661164	2.590067		0.085359
9.256566	1.3E+08	2.584121	2.0E+08	3.940363	3.262242		0.063156
17.26142	69154749	1.323094	57548571	1.150971	1.267073		0.014597
6.864192	1.5E+08	2.920876	95669778	1.913395	2.417136		0.094091
9.660342	1.6E+08	3.110372	1.5E+08	3.041374	3.075873		0.087795
6.319094	1.2E+08	2.319343	91848058	1.836961	2.078152		0.079274
5.592298	1.1E+08	2.118245	1.3E+08	2.549328	2.333786		0.122356
5.634562	52544668	1.050893	41919803	0.838396	0.944644		0.043972
6.638078	52011007	1.040220	50657100	1.013142	1.026681		0.044250
7.7525	1.2E+08	2.450307	1.2E+08	2.369606	2.409956		0.084415
5.148144	96853098	1.937661	70900540	1.418010	1.677836		ERR
5.37022	74235057	1.484701	74235057	1.484701	1.484701		0.077421
2.240956	16883706	0.333674	7587799.	0.151755	0.242715		0.030317
2.321712	38377623	0.767953	52501853	1.056037	0.911995		0.112995
1.386026	5863396.	0.117267	30827269	0.616545	0.366906		0.047785
0.308888	16653812	0.333076	8142767.	0.162885	0.247965		0.175184
0.280624	58517789	1.170355	37622396	0.752447	0.961401		ERR
0.325039	1.3E+08	2.508	1.5E+08	2.983621	2.745810		ERR
0.460304	1.5E+08	3.000242	3.5E+08	6.900556	4.950399		ERR
0	3.5E+08	7.028059	74962484	1.499249	4.260654		ERR
2.394392	61151351	1.223027	66129729	1.322594	1.272810		0.024753
2.394392	0	0	1.0E+08	2.081290	1.040645		0.073729
0.411851	0	0	23047297	0.460945	0.230472		0.113153
0.526927	0	0	1.2E+08	2.451648	1.225824		0.461360
0.323020	61029729	1.220594	10106756	0.202135	0.711364		0.375118
0	1.1E+08	2.194783	0	0	1.197591		ERR

#101

	Diapts	OPMO	DPM	duplo	I vol.	I dur	rel s
81.41	3	894.8	22885.7	24287.1	10	120	2197080
81.41	4	1538.2	24427.1	23762.2	10	120	2258890
81.41	10	2801.4	24128.5	20576.9	10	120	2132710
81.41	15	1327.4	12886.5	13239.4	10	120	1154110
81.41	15	942	23536.1	21544.6	10	120	2257410
81.41	23	2564.3	10610	12607.1	10	120	324570
81.41	27	2938	10078	11225.8	10	120	714000
81.41	28	2015.2	24974.4	23237.8	10	120	2285920
81.41	36	1684.4	5414.3	4857.6	10	120	372990
81.41	40	1912	15798.2	14849.8	10	120	1388420
81.41	50	2009.7	2593.3	2442.7	10	120	58360
81.41	60	1729.1	5268.1	4836.4	10	120	353900
81.41	90	1296.1	2744.1	3201.3	10	120	144800
81.41	100	1313.9	1130.2	1970.7	10	120	-18370
81.41	125	844.5	1733	3701.2	10	120	88850
81.41	150	1322.9	1466.4	1126.5	10	120	14350
81.41	200	1752.4	2674	1451.6	10	120	92160
81.41	200	680.6	1942.7	1192.7	10	120	126210
81.11	500	1434.7	1545.7	1734.8	10	135	11100
81.11	500	1807.3	2455.8	3654.7	20	116	32425
81.11	750	2044.3	1768.7	1401.2	10	135	-27560
81.11	750	2213.6	3250.9	2464.5	20	116	51865
81.11	1000	1436	2523.3	2534.1	20	116	54365
81.11	1250	1193.7	2166.4	2650.1	20	116	48635
81.11	1500	1041.8	1497.6	1175.8	10	135	45580
81.11	1500	1658.1	2923.3	2266.4	20	116	63260
81.33	2000	2065.8	1591.7	1877.8	20	120	-23705
81.33	2425	925	1270.2	1532.2	20	120	17260
81.33	2525	386.8	1276.6	1248	20	120	44490
81.33	2625	800	1639.2	1255.6	20	120	51560

duplo	nmol t/	duplo	k. f.	gem. vol.	x0 (numb)	x0 (Am3)	fg. l
2339230	1.2E-11	1.3E-11	2.0E+18		248511		0
2222400	1.2E-11	1.2E-11	2.0E+18	0.0865	437592.2	37851725	14.38365
1777550	1.2E-11	9.6E-12	2.0E+18	0.1114	416394	46386291	17.62679
1191200	6.2E-12	6.4E-12	2.0E+18	0.1114	384091.9	42787637	16.25937
2060260	1.2E-11	1.1E-11	2.0E+18		248826.9		0
1004280	4.5E-12	5.4E-12	2.0E+18	0.0782	209458.8	16379678	6.224277
828780	3.9E-12	4.5E-12	2.0E+18	0.1289	279110.1	35977291	13.67137
2122260	1.2E-11	1.1E-11	2.0E+18		421441.2		0
317320	2.1E-12	1.7E-12	2.0E+18	0.1507	177681.7	14836152	3.815731
1293780	7.5E-12	7.0E-12	2.0E+18		220057.9		0
43300	3.2E-13	2.3E-13	2.0E+18		79442.93		0
310730	1.9E-12	1.7E-12	2.0E+18		253369.4		0
190520	7.8E-13	1.0E-12	2.0E+18		150406.5		0
65680	-9.9E-14	3.6E-13	2.0E+18	0.0983	35734.18	3512669.	1.334814

255970	4.5E-15	1.5E-13	2.0E+18		142875.7		
-15640	7.5E-14	-1.1E-13	2.0E+18	0.1766	44819.14	79.5040.	3.007722
-30080	5.7E-17	-1.6E-13	2.0E+18		53655.67		
51210	6.8E-13	2.5E-13	2.0E+18		37046.45		
37010	5.0E-14	1.6E-13	2.0E+18	0.0918	69449.42	63751.2.	2.422575
94370	1.5E-17	5.1E-13	2.0E+18	0.0912	15236	231888.4.	0.250722
-64310	-1.5E-13	-3.5E-13	2.0E+18	0.3009	15645.32	4707977.	1.72907.
12545	2.8E-13	6.8E-14	2.0E+18	0.3009	22510.51	6773412.	2.573896
54905	2.9E-13	3.0E-13	2.0E+18	0.1596	17362.37	2771034.	1.052993
72820	2.6E-13	3.9E-13	2.0E+18	0.2924	7772.689	2272734.	0.863639
13400	2.5E-13	7.2E-14	2.0E+18	0.2539	7873.63	1999114.	0.759667
30415	3.4E-13	1.6E-13	2.0E+18	0.2539			0
-9400	-1.3E-13	-5.1E-14	2.0E+18	0.2231			0
30360	9.3E-14	1.6E-13	2.0E+18	0.2231	24226.56	5404945.	2.053577
43060	2.4E-13	2.3E-13	2.0E+18	0.2231	24529.39	5472506.	2.079332
22780	2.8E-13	1.2E-13	2.0E+18	0.2231	35734.18	7572295.	3.029472

5.37022	3.0E+08	6.049353	2.9E+08	5.705747	5.587550	ERR	3
8.751844	2.9E+08	5.766227	3.0E+08	5.938741	5.852484	0.154616	4
8.32788	2.3E+08	4.612021	2.8E+08	5.533517	5.072769	0.109359	10
7.651938	1.5E+08	3.090681	1.5E+08	2.999636	3.045158	0.071168	10
4.974578	2.7E+08	5.345539	2.9E+08	5.862252	5.503896	ERR	19
4.189176	1.3E+08	2.605699	1.1E+08	2.139424	2.372562	0.144847	23
5.532202	1.1E+08	2.150348	92627027	1.852540	2.001444	0.055630	27
6.428824	2.8E+08	5.506404	3.0E+08	5.956981	5.731692	ERR	28
3.593606	41165837	0.823316	48357891	0.967757	0.895337	0.061607	36
4.401158	1.7E+08	3.356834	1.8E+08	3.602905	3.479870	ERR	40
1.528555	5617297.	0.112345	7571027.	0.151420	0.131583	ERR	50
5.067388	40310915	0.806218	45911351	0.918227	0.862222	ERR	60
3.00813	26716106	0.494322	18784864	0.375697	0.433009	ERR	60
0.714653	8220648.	0.170412	-2383135	-0.04766	0.061375	0.017472	100
2.856714	37059891	0.741197	11526486	0.230529	0.485863	ERR	125
0.896382	-2547891		1861621.		0	0	150
1.273913	-3902270	-0.07804	11953891	0.239117	0.080536	ERR	200
0.740929	6643459.	0.132869	16373189	0.327463	0.230166	ERR	200
1.388989	3440612.	0.069212	1280000	0.0256	0.047406	0.06743E	500
0.50472	12664753	0.253295	4351537.	0.087030	0.170162	0.073451	500
0.312925	-7418927		-3178090		0	0	750
0.450210	1687578.	0.033671	6960447.	0.139228	0.056440	0.012761	750
0.347247	7363424.	0.147363	7295953.	0.145919	0.146643	0.022520	1000
0.155433	5772674.	0.195453	6526971.	0.130539	0.162996	0.071718	1250
0.157472	1545225.	0.030904	5256072.	0.105121	0.068012	0.034021	1500
0	4081799.	0.081635	8489692.	0.169793	0.125714	ERR	1500
0	-1219459				0	ERR	2000
0.484531	3938594.	0.078771	2239135.	0.044782	0.061777	0.011429	2425
0.490587	5586162.	0.111723	5771675.	0.115433	0.113578	0.020754	2525
0.714683	2955243.	0.059104	6740756.	0.134815	0.09696	0.012162	2625

*Handwritten notes:*  
P...  
E...

stati	die	irradi	inc	prod c	chlor	prod pe	inciden	stati	die	irradi	inc	prod c	chlor	prod pe	inciden
20/9	8	65	24	2.2	0.457	4.814	1637.00	43/1	6.5	65	24	1.19	0.318	3.742	2209.00
20/9	20	33	24	2.25	0.529	4.253		43/1	17	33	24	1.7	0.365	4.658	
20/9	34	14.5	24	1.87	0.395	4.734		43/1	29	14.5	24	1.54	0.354	4.350	
20/9	48	6.4	24	1.22	0.485	2.515		43/1	41	6.4	24	1	0.263	3.802	
20/9	62	3	24	0.78	0.429	1.818		43/1	52	3	24	0.73	0.318	2.296	
20/9	71	1.8	24	0.74	0.362	2.044		43/1	59	1.8	24	0.61	0.233	2.618	
20/9	94	0.5	24	0.17	0.396	0.429		43/1	78	0.5	24	0.23	0.209	1.100	
						ERROR		0						ERROR	
20/17	8	65	24	2.92	0.404	7.228	1637.00	47/1	3.5	65	24	5.82	1.381	4.214	1734.00
20/17	20	33	24	2.35	0.358	6.564		47/1	8.7	33	24	6.4	1.381	4.634	
20/17	34	14.5	24	2.84	0.404	7.030		47/1	15	14.5	24	5.91	1.381	4.280	
20/17	48	6.4	24	1.47	0.388	3.789		47/1	22	6.4	24	5.9	1.381	4.272	
20/17	62	3	24	0.6	0.36	1.667		47/1	28	3	24	3.83	1.381	2.773	
20/17	71	1.8	24	0.38	0.346	1.098		47/1	32	1.8	24	3.18	1.381	2.303	
20/17	94	0.5	24	0.16	0.286	0.559		47/1	58	0.5	24	0.74	1.381	0.536	
						ERROR								ERROR	
20/17	8	65	1	1.99	0.404	4.926	1637.00								
20/17	20	33	1	1.8	0.358	5.028									
20/17	34	14.5	1	1.36	0.404	3.366		45/1	6.5	65	24	1.04	0.3	3.467	1992.00
20/17	48	6.4	1	0.61	0.388	1.572		45/1	17	33	24	1.54	0.314	4.904	
20/17	62	3	1	0.23	0.36	0.639		45/1	29	14.5	24	1.24	0.358	3.464	
20/17	71	1.8	1	0.1	0.346	0.289		45/1	41	6.4	24	1.18	0.355	3.324	
20/17	94	0.5	1	0.03	0.286	0.105		45/1	52	3	24	0.81	0.365	2.219	
0						ERROR		45/1	59	1.8	24	0.34	0.241	1.411	
30/3	7.5	65	1	1.49	0.13	11.462	2394.00	45/1	78	0.5	24	0.04	0.082	0.488	
30/3	20	33	1	1.18	0.117	10.085								ERROR	
30/3	35	14.5	1	0.62	0.159	3.899		inter	2		1	8.45		101.400	
30/3	50	6.4	1	0.65	0.385	1.688		inter	10		1	3.05		36.600	
30/3	64	3	1	0.2	0.247	0.810		inter	15		1	1.24		14.900	
30/3	73	1.8	1	0.11	0.163	0.675		inter	20		1	0.26		3.100	
30/3	96	0.5	1	0.01	0.232	0.043		inter	25		1	0.21		2.500	
0						ERROR		inter	35		1	0.13		1.600	
30/3	7.5	65	24	1.7	0.13	13.077	2394.00							ERROR	
30/3	20	33	24	1.46	0.117	12.479		51/16	3	65	1	4.16	0.91	4.571	2340.00
30/3	35	14.5	24	0.97	0.159	6.101		51/16	7	33	1	3.23	0.9	3.589	
30/3	50	6.4	24	1.7	0.385	4.416		51/16	15	14.5	1	2.62	1.01	2.594	
30/3	64	3	24	0.62	0.247	2.510		51/16	23	6.4	1	0.92	0.99	0.929	
30/3	73	1.8	24	0.39	0.163	2.393		51/16	30	3	1	0.48	1.27	0.378	
30/3	96	0.5	24	0.07	0.232	0.302		51/16	36	1.8	1	0.18	1.19	0.151	
						ERROR		51/16	48	0.5	1	0.04	0.75	0.053	
0						ERROR		0						ERROR	
37/1	7.4	65	24	0.95	0.132	7.197	1663.00	51/16	1.5	65	24	4.64	0.91	5.099	2340.00
37/1	19	33	24	1.16	0.141	8.227		51/16	3.5	33	24	5.96	0.9	6.622	
37/1	33	14.5	24	1.19	0.145	8.207		51/16	9.5	14.5	24	5.27	1.01	5.218	
37/1	46	6.4	24	2.5	0.975	2.564		51/16	16	6.4	24	4.69	0.99	4.737	
37/1	59	3	24	2.26	0.816	2.770		51/16	22	3	24	2.9	1.27	2.283	
37/1	68	1.8	24	0.6	0.332	1.807		51/16	26	1.8	24	1.61	1.19	1.353	
37/1	89	0.5	24	0.07	0.077	0.909		51/16	34	0.5	24	0.22	0.75	0.293	
0						ERROR		0						ERROR	
39/1	7	65	24	1.28	0.245	5.224	1011.00	51/26	2	65	1	9.42	1.37	6.876	2215.00
39/1	18	33	24	1.23	0.269	4.572		51/26	6	33	1	9.15	1.43	6.399	
39/1	31	14.5	24	1.43	0.363	3.939		51/26	11	14.5	1	6.08	1.4	4.343	
39/1	43	6.4	24	1.11	0.256	4.336		51/26	17	6.4	1	2.36		ERROR	
39/1	56	3	24	0.45	0.352	1.278		51/26	23	3	1	0.66	0.92	0.717	
39/1	66	1.8	24	0.79	0.36	2.194		51/26	28	1.8	1	0.34	0.94	0.362	
39/1	84	0.5	24	0.1	0.195	0.513		51/26	38	0.5	1	0.12	0.57	0.211	
						ERROR								ERROR	
						ERROR		51/26	1.2	65	24	9.9	1.37	7.226	2215.00

stati	die	irradi	inc	prod c	chlor	prod pe	inciden
51/26	5	33	24	10.85	1.43	7.587	
51/26	12	14.5	24	10.04	1.4	7.171	
51/26	20	6.4	24	7.62		ERROR	
51/26	28	3	24	2.14	0.92	2.326	
51/26	33	1.8	24	1.11	0.94	1.181	
51/26	43	0.5	24	0.26	0.57	0.456	
						ERROR	
64/1	2	65	24	4.94	1.06	4.660	2025.00
64/1	3.5	33	24	6.2	1.06	5.849	
64/1	9	14.5	24	5.33	1.01	5.277	
64/1	14	6.4	24	4.51	1.01	4.465	
64/1	20	3	24	2.63	0.79	3.329	
64/1	23	1.8	24	1.6	0.79	2.025	
64/1	31	0.5	24	0.27	0.31	0.871	
						ERROR	
66/1	1.5	65	24	2.47	0.89	2.775	2418.00
66/1	4	33	24	3.71	0.89	4.169	
66/1	11	14.5	24	2.37	0.61	3.885	
66/1	18	6.4	24	1.39	0.61	2.279	
66/1	23	3	24	0.92	0.45	2.044	
66/1	27	1.8	24	0.5	0.45	1.111	
66/1	36	0.5	24	0.09	0.3	0.300	
0						ERROR	
68/1	1	65	24	5.86	1.67	3.509	1389.00
68/1	2.2	33	24	6.67	1.67	3.994	
68/1	6.4	14.5	24	5.77	1.67	3.455	
68/1	10	6.4	24	5.38	1.59	3.384	
68/1	14	3	24	3.12	1.57	1.987	
68/1	17	1.8	24	2.15	2.23	0.964	
68/1	23	0.5	24	0.48		0.240	
0						ERROR	
71/1	0.7	65	24	19.1	3.51	5.442	1450.00
71/1	2.4	33	24	21.2	3.51	6.040	
71/1	6.5	14.5	24	21	3.51	5.983	
71/1	10	6.4	24	16.5	3.44	4.797	
71/1	14	3	24	10.6	3.44	3.081	

68/1	14	3	24	3.12	1.57	1.987	
68/1	17	1.8	24	2.15	2.23	0.964	
68/1	23	0.5	24	0.48		0.240	
0						ERROR	
71/1	0.7	65	24	19.1	3.51	5.442	1450.00
71/1	2.4	33	24	21.2	3.51	6.040	
71/1	6.5	14.5	24	21	3.51	5.983	
71/1	10	6.4	24	16.5	3.44	4.797	
71/1	14	3	24	10.6	3.44	3.081	
71/1	17	1.8	24	5.37	3.44	1.561	
71/1	22	0.5	24	1.01	2.94	0.344	
						ERROR	
81/1	1.2	65	1	12.8	2.26	5.664	767.00
81/1	4	33	1	11.1	2.26	4.912	
81/1	10	14.5	1	5.4	2.37	2.278	
81/1	16	6.4	1	2.1	2.36	0.890	
81/1	23	3	1	0.93	2.5	0.372	
81/1	27	1.8	1	0.63	2.52	0.250	
81/1	30	0.5	1	0.27	2.52	0.107	
						ERROR	
81/1	1	65	24	18	2.26	7.965	767.00
81/1	3	33	24	18.4	2.26	8.142	
81/1	8.4	14.5	24	13.1	2.37	5.527	
81/1	14	6.4	24	7.5	2.36	3.178	
81/1	19	3	24	4.1	2.5	1.640	
81/1	22	1.8	24	2.3	2.52	0.913	
81/1	30	0.5	24	0.82	2.52	0.325	
0						ERROR	
81/31	1	65	1	14	2.37	5.907	1588.00

71/1	17	1.8	24	5.37	3.44	1.561	
71/1	22	0.5	24	1.01	2.94	0.344	
						ERROR	
81/1	1.2	65	1	12.8	2.26	5.664	767.00
81/1	4	33	1	11.1	2.26	4.912	
81/1	10	14.5	1	5.4	2.37	2.278	
81/1	16	6.4	1	2.1	2.36	0.890	
81/1	23	3	1	0.93	2.5	0.372	
81/1	27	1.8	1	0.63	2.52	0.250	
81/1	30	0.5	1	0.27	2.52	0.107	
						ERROR	
81/1	1	65	24	18	2.26	7.965	767

stati	die	irradi	inc	prod c	chlor	prod pe	inciden
81/31	3	33	1	12.9	2.37	5.443	
81/31	8	14.5	1	9.4	2.09	4.498	
81/31	13	6.4	1	6.4	2.09	3.062	
81/31	18	3	1	2	2.2	0.909	
81/31	21	1.8	1	1	2.2	0.455	
81/31	28	0.5	1	0.18	2.47	0.073	
						ERROR	
81/31	1	65	24	6	2.37	2.532	1588.00
81/31	2.8	33	24	6.005	2.37	2.534	
81/31	7.2	14.5	24	4.407	2.09	2.109	
81/31	12	6.4	24	3.616	2.09	1.730	
81/31	16	3.0	24	3.378	2.2	1.535	
81/31	19	1.8	24	2.268	2.2	1.031	
81/31	25	0.5	24	0.482	2.47	0.195	
						ERROR	
						ERROR	
						ERROR	

$prod\ c = \frac{m\ mol\ c}{l\ daq}$   
 $12.01\ \mu g$   
 $prod\ pe = \frac{m\ mol\ c}{\mu g\ chlor\ a}$