

All rights reserved

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

printed by  *texel*

ONDERZOEK NAAR DE BETROUWBAARHEID VAN DE ^{14}C -METHODE
MET BEHULP VAN TRACK-AUTORADIOGRAFIE *

door

M.A. WILDSCHUT

INHOUD

I.	Summary	2
II.	Samenvatting	3
III.	Inleiding	4
IV.	Materiaal en methoden	6
	A. Inleiding	6
	B. ^{14}C -methode	6
	C. Acid bubbling-methode	7
	D. Track-autoradiografie	10
	1. Algemeen	10
	2. Opwerken van een planktonmonster	12
	3. Opbrengen van de emulsie en belichten	13
	4. Ontwikkelen en microscopie	14
	E. Opzet van de experimenten	15
V.	Resultaten en discussie	19
	A. Invloed van incubatiemethode, excretie en bak- terioplankton	19
	B. Track-autoradiografie	23
	1. Methode	23
	2. Resultaten	25
	3. Conclusies	28
VI.	Literatuur	29

* Intern verslag over werk verricht als doctoraal studie in de Biologie voor de Universiteit te Utrecht bij dr. J.J. Zijlstra in het tijdvak maart tot september 1980 aan het NIOZ te Texel, onder leiding van dr. W.W.C. Gieskes.

I. SUMMARY

There are many difficulties when measuring primary production of aquatic ecosystems by the ^{14}C -method. The most pronounced problem is that one measures on the system-level whereas the results consist of the combined effect of (1) the physiological properties of the different algal species and (2) the interactions between autotrophs and heterotrophs. Excretion turned out to be negligible. In order to have a control on the existence of "bottle-enclosure effects", a series of short incubations was carried out simultaneously with a long incubation. Over the same time the production of the short incubations was less than that of the one long incubation. This may be caused by a temporal decrease of the rate of production at the beginning of the incubation. A third factor, the influence of the bacterioplankton on ^{14}C results, could not be investigated because of methodological problems.

For measuring the primary production on the species level autoradiography seemed a suitable method. When using a light microscope two variants are possible: grain density and track-autoradiography. For quantitative application track-autoradiography should be the method of choice because there is no relevant background, which makes interpretation of the autoradiograms more reliable. In practice this method proved to be a difficult one. The problems encountered are discussed in detail.

Primary production estimates from track-counts agreed well with those calculated from carbon content of the cell and doubling-time.

II. SAMENVATTING

Aan het meten van de primaire productie van aquatische oecosystemen met behulp van de ^{14}C -methode kleeft een aantal bezwaren. Het voornaamste is wel dat de methode meet op systeem-nivo terwijl de resultaten de opstelsom zijn van (1) de fysiologische eigenschappen van de verschillende algen-soorten en (2) de interacties tussen autotrophen en heterotrophen. Aan drie van dit type factoren is enig onderzoek verricht. De eerste, excretie, bleek verwaarloosbaar. De invloed van de incubatiemethode, met het oog op "bottle-enclosure-effecten", werd onderzocht door vergelijking van een serie korte incubaties bij elkaar, met één lange. De productie van de eerste serie was langer dan die van de lange incubatie. Wellicht wordt dit veroorzaakt door een tijdelijke terugslag in opnamesnelheid aan het begin van een incubatie. Onderzoek naar de invloed van bacteriën stuitte op methodische problemen.

De bepaling van de primaire productie op (cel- c.q.) soortsnivo bleek mogelijk met autoradiografie. Van de voor het lichtmicroscopisch geschikte varianten van deze methode verdient track-autografie bij kwantitatieve bepaling de voorkeur boven grain density-autoradiografie, omdat bij de eerste variant relevante achtergrond vrijwel ontbreekt, hetgeen correcte interpretatie van de autoradiogrammen belangrijk eenvoudiger maakt. De praktische uitvoering van track-autoradiografie bleek niet eenvoudig; de ondervonden problemen worden in detail besproken.

De op grond van track-tellingen berekende primaire productie kwam goed overeen met die berekend uit koolstofinhoud en verdubbelingstijd.

II. INLEIDING

Een van de oudste methoden om de primaire productie in een waterig milieu te meten is de ^{14}C -methode van STEEMANN NIELSEN (1952, 1977, VOLLENWEIDER 1974). Deze methode wordt veel gebruikt omdat ze èn zeer gevoelig is èn vrijwel overal, van regenpoeltje tot wereldoceaan, toegepast kan worden. In vele publicaties is kritiek geleverd op de methode (CONOVER & FRANCIS 1973, HARRIS 1978). De kritiek richt zicht zowel op de technische als op de meer theoretische kanten van de methode. Eén van de punten van discussie is het "NPP/BPP-probleem": wordt er met de ^{14}C -methode netto, of bruto primaire productie (NPP resp. BPP) gemeten, of wordt alleen de grootte van de pool waarbinnen het ^{14}C circuleert bepaald? BUCKINGHAM et al. (1975), GIESKES et al. (1979), HARRIS & PICCININ (1977) en SALONEN & HOLOPAINEN (1978) zijn van mening dat wát er gemeten wordt afhankelijk is van de proefopzet. Volgens HARRIS & PICCININ (1977) is de lichtintensiteit de bepalende factor, volgens de overige auteurs is dat de incubatieduur.

In Fig. 1 is weergegeven hoe de incubatieduur invloed heeft op de filterwaarde = primaire productie. Iets dergelijks is eveneens te vinden bij BUCKINGHAM et al. (1975) en HOBSON et al. (1976).

In de praktijk blijkt een verloop als in Figuur 1 getekend is meestal niet of niet duidelijk aanwezig. Voorwaarden voor een dergelijk verloop zijn een proefopzet die geen artefacten veroorzaakt en algen die qua koolstofwisseling volkomen identiek zijn. Ook al zou aan de eerste voorwaarde voldaan kunnen worden dan nog is het in veldmonsters, waar het in dit onderzoek om gaat, een zeldzaamheid wanneer we slechts één soort in het monster aantreffen met in fysiologisch opzicht identieke cellen.

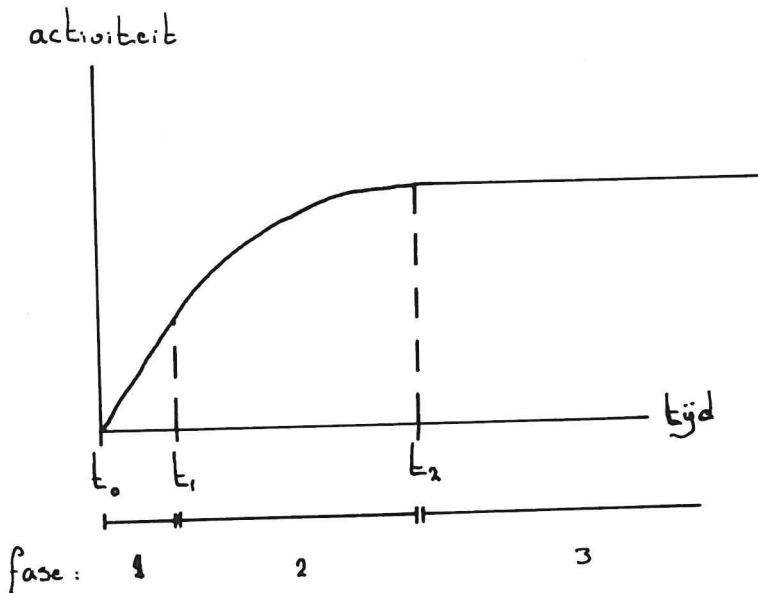


Fig. 1. Theoretisch verband tussen filterwaarde en tijd bij incubatie volgens de ^{14}C -methode. De algen zijn qua koolstofmetabolisme identiek verondersteld. t_0 = moment van toedienen van een radio-actieve bicarbonaat-oplossing; t_1 = moment waarop er ^{14}C uit de cel begint te verdwijnen, door b.v. respiratie, excretie; t_2 = moment waarvanaf opname en verwijdering van ^{14}C met elkaar in evenwicht zijn. In fase 1 wordt bruto primaire productie of productiviteit gemeten (= de hoeveelheid door de cellen gefixeerd koolstof sec, resp. per tijdseenheid); in fase 3 netto primaire productie of, maar dat alleen op tijdstip t_2 (!), productiviteit (= de hoeveelheid door de cellen gefixeerd koolstof minus die hoeveelheid die verdwenen is uit de cel, b.v. door excretie, respiratie); in fase 2 wordt iets gemeten dat tussen bruto en netto primaire productie/productiviteit inligt.

Willen we toch een uitspraak doen over de vraag of er BPP dan wel NPP bepaald wordt dan zullen we moeten afdalen tot op soortsnivo. De conventionele uitvoering van de ^{14}C -methode leent zich daar echter niet toe. Ook de techniek van gedifferentieerd filtreren (o.a. BARNET & HIROTA 1967, DERENBACH & WILLIAMS 1974, KALFF 1972) is hiervoor niet geschikt (BERMAN 1975): grootteklassen en soorten zijn niet eenduidig correlleerbaar.

Een methode waarmee het wel mogelijk is om op soortsnivo

(celnivo) te kijken, letterlijk en figuurlijk, is autoradiografie (MOMMAERTS 1972, ROGERS 1979). Van deze techniek zijn voor lichtmicroscopie twee varianten bekend, grain density en track-autoradiografie (ROGERS 1979). In dit onderzoek is de tweede variant toegepast (KNOECHEL & KALFF 1976a). Excretie (AARONSON 1978, BERMAN & HOLM-HANSEN 1974, JASSBY & GOLDMAN 1974, MAGUE et al. 1980, SHARP 1977, 1978) veroorzaakt evenals bij de ^{14}C -methode ook bij autoradiografie een onderschatting van de werkelijke PP. Bacterioplankton is in staat om (gelabelde) excretieproducten op te nemen (HERBLAND 1975, HOPPE 1978, JOIRIS 1977, LARSSON & HAGSTRÖM 1979, POMEROY 1974, SIEBURTH et al. 1978, STRASKRABOVA & KOMARKOVA 1979, WIEBE & SMITH 1977) en ^{14}C - CO_2 te verademen, waardoor excretie-bepalingen te laag uit komen (NALEWAJKO et al, 1976). Daarom is naar deze beide aspecten, excretie en consumptie door bacterioplankton, tevens enig onderzoek verricht.

IV. MATERIAAL EN METHODEN

A. Inleiding

In het hier beschreven onderzoek zijn drie technieken toegepast, nml. de ^{14}C -methode, de acid bubbling-methode en track-autoradiografie. Deze technieken worden hieronder ieder apart behandeld, gevolgd door een beschrijving van de uitgevoerde experimenten.

B. ^{14}C -Methode

De ^{14}C -techniek (STEEMANN NIELSEN 1952, 1977) wordt gebruikt ter bepaling van de primaire productie. Infuusflessen, merk Neubor I, met een volume van 100 ml, werden volledig gevuld met zeewater. Aan elke fles werd bij de start van de incubatie

0,5 ml van een gelabeld bicarbonaat-oplossing (activiteit $\pm 4,5 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$, specifieke activiteit $40 \mu\text{Ci.mmol}^{-1}$, Radio Chemical Centrum Amersham) toegevoegd. De flessen werden in situ geïncubeerd op ± 10 cm diepte. Per incubatieperiode werden een lichte en een donkerfles (= fles omwikkeld aluminiumfolie) gesuspendeerd.

Na incubatie werden de flessen in een donkere box zo snel mogelijk naar het laboratorium overgebracht en daar direct afgefiltreerd. De monsters werden dus niet gefixeerd: momenteel is nog geen fixatief bekend dat niet weglekken van activiteit uit de cel veroorzaakt (SILVER & DAVOLL 1978). Voor het filtreren werd gebruik gemaakt van Millipore-filters (SHELDON 1972), poriediameter $0,45 \mu$. De bij filtratie aangelegde onderdruk werd beneden 100 mm kwikdruk gehouden (MAGUE et al. 1980). Duplo's, afgefiltreerd bij deze onderdruk en afgefiltreed zonder onderdruk vertoonden geen significante verschillen. Vervolgens werden de, nog natte, filters enkele minuten in de damp van geconcentreerde HCl gehouden (LEAN & BURNISON 1979, STEEMANN NIELSEN 1977), in een telflesje gedaan en zo enkele uren aan de lucht gedroogd. Aan elk flesje werd nu 10 ml 2-methoxy-ethanol-tolueen (PUGH 1973) toegevoegd, om het filter te laten oplossen. De volgende morgen werd de activiteit bepaald met een Nuclear Chicago Mark I vloeistofscintillatieteller. Chemische quenchcorrectie werd uitgevoerd door middel van de kanalen-verhouding methode (BRUIN 1978), optische (= fysische) quenching werd verondersteld verwaarloosbaar te zijn (GACHTER & MARES 1979).

C. Acid bubbling-methode

De excretie van oplosbare organische koolstofverbindingen door een planktonmonster werd bepaald met de acid bubbling-

methode naar SCHINDLER et al. (1972), gewijzigd volgens THEODORSSON & BJARNASON (1975). Het monster werd na incubatie met $^{14}\text{C-HCO}_3^-$ door filtratie (over een $0,45 \mu$ Millipore-filter) in twee fracties verdeeld, nml het filtraat met daarin de uitgescheiden oplosbare koolstofverbindingen (Dissolved Organic Carbon of DOC) en het filter met daarop de organische koolstofverbindingen, vastgelegd in deeltjes (Particulate Organic Carbon of POC). Filtratie vond plaats zonder onderdruk om eventuele beschadigingen van cellen door filtratie (ARTHUR & RIGLER 1967) tot een minimum te beperken.

Het filtraat werd m.b.v. een kleine glazen trechter opgevangen in een 100 ml bekerglas. Hieruit werden twee telflesjes elk met 5 ml filtraat gevuld. Een groter volumen is, gezien de gebruikte scintillatiecocktail (zie onder) zeker mogelijk (tot 10 ml) en van wege de geringe activiteit van de monsters zelfs aanbevelenswaardig, maar de kans dat er vloeistof uit het telflesje spat bij doorluchten wordt dan te groot. Na iedere filtratie werden de filterhouders, trechters en bekerglaasjes enkele keren gespoeld met kraanwater en met tissues afgedroogd.

De telflesjes werden met een van te voren experimenteel bepaalde hoeveelheid 0,5 N zoutzuur (in dit onderzoek 0,05 ml) aangezuurd tot pH 2,8 (ANDERSON & ZEUTSCHEL 1970, MAGUE et al. 1980). Uit een controle-experiment bleek dat onder de gegeven omstandigheden 15 minuten doorborrelen met lucht ruimschoots voldoende was om radio-actieve anorganische koolstofverbindingen (CO_2 en HCO_3^-) volledig te verwijderen uit het filtraat (Figuur 2). De waarde van het bereikte constante nivo wordt opgevat als de som van de apparatuurachtergrond plus eventuele verontreiniging van de ^{14}C -oplossing met andere

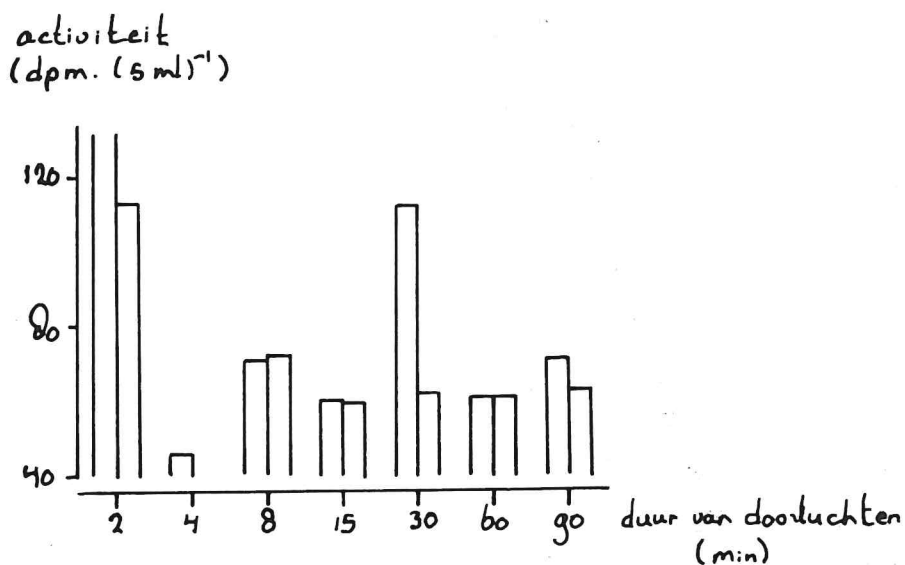


Fig. 2. Bepaling van de juiste doorluchttijd bij excretiebepalingen m.b.v. de acid bubbling-methode. De metingen zijn in duplo uitgevoerd. In elk telflesje zat 5 ml gefiltreerd zeewater (over een 0,45 μ Millipore-filter) met 20 μ l $^{14}\text{C-CO}_3^{2-}$ -oplossing, activiteit + 4,5 $\mu\text{Ci.ml}^{-1}$. Na aanzuren met 0,05 ml 0,5 N HCl werd gedurende verschillende tijden lucht door de vials geleid.

actieve verbindingen (WILLIAMS et al. 1972). De meetresultaten zijn gecorrigeerd voor deze achtergrond. Om spetters die boven het vloeistofnivo aan het glas kleefden "terug te halen" zodat ook daaruit anorganisch ^{14}C verwijderd werd werden de flesje na 5 minuten doorluchten stuk voor stuk voorzichtig rondge-
wenteld. Door deze behandeling werd de spreiding in de uitkomsten van duplo-bepalingen teruggebracht tot praktisch nihil. Voor het tegelijkertijd doorborrelen van grote aantallen telflesjes werd gebruik gemaakt van een "borrelkamer".

Aan elke vial werd 10 ml Insta Gel toegevoegd. Dit scintillatiecocktail is gekozen vanwege zijn groot wateropnemend vermogen. Na schudden en afkoelen werd elk flesje twee keer 100 minuten geteld; correctie werd uitgevoerd als bij de ^{14}C -methode.

D. Track-autoradiografie

1. Algemeen

De techniek van track-autoradiografie is in dit onderzoek toegepast ter bepaling van de primaire productiviteit op soortsnivo.

Autoradiografische technieken berusten op het feit dat fotografisch materiaal niet alleen gevoelig is voor licht, maar ook voor straling. Wanneer een radio-actieve bron met dit materiaal bedekt wordt zal na ontwikkelen op die plaatsen waar in de bron actief materiaal aanwezig is zwarting optreden (ROGERS 1979). Door zwarting is het mogelijk de plaatsen waar de gelabelde stof zicht bevindt zeer nauwkeurig vast te stellen. De techniek leent zich, behalve voor kwalitatief, de oudste toepassing (BARKAS 1963), ook voor quantitatief gebruik, zij het dat er dan zekere restricties gelden (zie verder).

In het algemeen gesproken is de afstand (weg) die een deeltje in een medium aflegt afhankelijk van de beginenergie van het deeltje (die op zijn beurt bepaald wordt door het gebruikte isotoop) en van het medium. Is dit medium, in dit geval een fotografische laag (FL), dik ten opzichte van de weg, dan verliest het deeltje in een serie botsingen (met zilverbromide-kristallen) al z'n energie binnen de laag. Het resultaat is, na ontwikkelen, een spoor -"track"- van zilverkorrels. Deze techniek staat bekend als track-autoradiografie (TAR) (BARKAS 1963, 1973, BROCK et al. 1975, LEVI et al., 1963, ROGERS 1979). Wanneer de FL relatief dun is zal het deeltje meestal maar één à twee korrels (PELE 1972) aanslaan alvorens het de FL verlaat. Dit is het geval bij grain density-autoradiografie (GAR) (ROGERS 1979). NB: we beperken ons tot de voor lichtmicroscopie geschikte varianten van autoradiografie; de

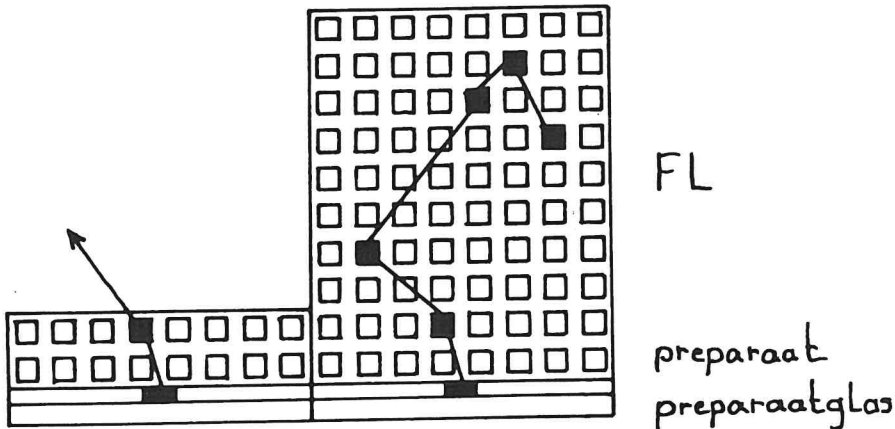


Fig. 3. Schematische weergave van het verschil tussen grain density en track-autoradiografie. De linkerhelft van de figuur stelt een grain density-preparaat voor, de rechterhelft een track-preparaat. ■ = ^{14}C -atoom; □ = zilverbromidekristal; ■ = latent image; — = baan van elektron. Korrels en latent images zijn gevat in een gelatinematrix (kader).

overige toepassingen, op macroscopisch en electronenmicroscopisch nivo, zijn met betrekking tot bepaling van primaire productie (voorlopig?) niet interessant. De toepassingen van TAR liggen vooral op het vlak van de deeltjesfysica (BARKAS 1963); GAR wordt het meest toegepast in medische en biologische studies, de laatste tijd veel kwantitatief ("density"). Het verschil tussen TAR en GAR wordt in Fig. 3 nog eens verduidelijkt.

Een bij microscopische waarneming zichtbare korrel is zoals al gezegd het gevolg van een botsing tussen een energierijk deeltje en een zilverbromidekristal. Het kristal raakt door de botsing in een aangeslagen toestand, is nu een "latent image" (BARKAS 1963, ROGERS 1979) en zal bij ontwikkelen zwart kleuren. Vorming van deze latent images kan echter naast straling ook door andere gebeurtenissen veroorzaakt worden: warmte, druk of inwerking van bepaalde chemicaliën ("chemo-

grafie", ROGERS 1979) kunnen voldoende zijn om de zeer gevoelige kristallen in aangeslagen toestand te brengen. De door dit type oorzaken ontstane zwarting vat men samen onder de term "achtergrond". Bij GAR moet voor deze achtergrond gecorrigeerd worden (PEARL & STULL 1979, ROGERS 1979), bij TAR kan dat achterwege gelaten worden: achtergrond manifesteert zich in de vorm van korrels en niet als tracks.

2. Opwerken van een planktonmonster

Het plankton wordt voor microscopische waarneming op een microscopglaasje gebracht. Om de FL beter op deze glaasjes te laten hechten wordt zo voorbehandeld (ROGERS 1979). Allereerst worden de glaasjes ontvet door ze een nacht in een chroom zwavelzuur-bad te leggen (BARKAS 1963, ROGERS 1979). Vervolgens worden ze ondergedompeld in een gelatine-oplossing (ROGERS 1979). Tenslotte worden de glaasjes gedurende een nacht op een stofvrije plaats te drogen gezet.

Uit de mogelijk manieren om plankton te concentreren, te weten bezinken (o.a. COULON & ALEXANDER 1972, KNOECHEL & KALFF 1976b, LUND et al. 1958, SANDFORD et al. 1969), filtreren (WATT 1971) en centrifugeren (van IWAARDEN 1979, PRICE et al. 1978, WIEBE & SMITH 1977), is vanwege de korte bewerkingstijd voor de laatste methode gekozen (zie ook DESCOLAS-GROS 1980). Er werd gecentrifugeerd met een twee fasen-systeem (monster plus sorbitol), naar PRICE et al. (1978), gewijzigd naar van IWAARDEN (1979). Voordeel van dit systeem is dat het plankton, eenmaal in de sorbitol, niet meet opdwarrelt bij bv. stoten tegen de buis of bij het afpipetteren van de waterfractie. In een centrifugebuis die van onderen uitliep in een punt werd 10 ml monster gepipetteerd. Met een Pasteurpipet werd $\pm 0,5$ ml

sorbitol onder in de buis gebracht. De buis werd ongeveer 7 minuten gecentrifugeerd bij een toerental van 1000 rpm in een swing out-centrifuge. Opstarten en afremmen gebeurde geleidelijk. De waterfractie werd afgepipetteerd, de sorbitolfractie enkele malen opgezogen en teruggedrukt, om klontering van het plankton tegen te gaan. Na de buis nog even op een buizenschudder gehouden te hebben werd de fractie op een preparaatglaasje overgebracht. De volgende dag werden de sorbitol, de zoutkristallen en het $^{14}\text{C-HCO}_3^-$ in enkele spoelbeurten verwijderd. Bij controle bleek het laatste waswater geen activiteit meer te bevatten. Na nogmaals een nacht drogen waren de preparaten klaar voor de eigenlijk autoradiografie-behandeling. Elk monster werd op deze wijze in vier opgewerkt. Naderhand is centrifugeren achterwege gelaten (zie Resultaten in discussie). Door gebruik te maken van dichte algensuspensies uit cultures kon toch de benodigde hoge celdichtheid bereikt worden.

NB: Het plankton werd na incubatie met $^{14}\text{C-HCO}_3^-$ niet gefixeerd. Naast het nadeel dat fixatieven weglekken van ^{14}C uit de cel kunnen veroorzaken (SILVER & DAVOLL 1978) kunnen ze ook misleidende zwarting van de foto-emulsie ("chemografie") veroorzaken (ROGERS 1979).

3. Opbrengen van de emulsie en belichten

Bij autoradiografie is de juiste keuze van merk en soort materiaal van het grootste belang. Voor een zij het gedeeltelijk verouderd, overzicht van beschikbare merken en typen emulsies, zie BARKAS (1963). In dit onderzoek is gebruik gemaakt van Ilford G5 Nuclear Research Emulsion in Gel-form (BARKAS 1963, 1973, ANON., LEVI et al. 1963, ROGERS 1979). De reden dat de keus op Ilford viel was dat de transportweg en -tijd kort zijn,

dat de levertijd kort is ($\pm 1\frac{1}{2}$ maand) en dat de emulsie minder gevoelig is voor licht en luchtvochtigheid, e.e.a. in vergelijking met een gelijkwaardige emulsie van Kodak (ROGERS 1979). Het type G5 is gekozen omdat deze emulsie gevoelig genoeg is voor ^{14}C , een grote korreldiameter heeft ($\pm 0,27 \mu$), waardoor de korrels ook bij geringe vergroting nog goed zichtbaar zijn, en omdat er veel fundamenteel fysisch werk aan verricht is (LEVI et al. 1963).

In dit onderzoek zijn twee (van de vier mogelijke, zie BARKAS 1973) manieren om emulsie op het preparaatglas te brengen uitgeprobeerd: dippen van het preparaat in de emulsie (de "dipmethode") en opspuiten van de emulsie op een preparaat met een micropipet (de "druppelmethode") (ROGERS 1979 pag. 380 resp. 382). In plaats van de voorgeschreven ontwikkelaar is het, eenvoudiger te bereiden, Brussels Amidol (BARKAS 1963) gebruikt. Om de gesmolten emulsie op de preparaten snel te laten drogen werden de preparaten op een ongeveer 1 cm dikke aluminium plaat, die op smeltend ijs lag, gelegd. Na drogen, op kamertemperatuur, in een ruimte waarin silica-gel aanwezig was, werden de preparaten in met aluminium omwikkelde plastic preparaatdozen horizontaal weggezet voor de belichtingsfase. Van elke monster werden replicaplaten gedurende resp. 1, 2, 4 en 8 dagen belicht (KNOECHEL & KALFF 1976b, 1979). Bij pilot-experimenten werd een belichtingsfase van 2 dagen aangehouden.

4. Ontwikkelen en microscopie

Tijdens de ontwikkelfase stonden de rekjes, met daarin de preparaten, verticaal in 500 ml-bekerglazen, steeds één rekje per bekerglas. Moest er, volgens voorschrift, geroerd worden dan werd het rekje in een 1 liter-bekerglas geplaatst, op een

+ 2 cm hoge ring van PVC-buis. Binnen deze ring kon de roervlo vrij draaien. Tegen het omvallen werd er een leeg rekje naastgezet.

NB: het is van belang dat de preparaten tijdens de behandeling zoveel mogelijk horizontaal gehouden worden, ook bij het opbrengen van de emulsie en bij belichten. In een niet-horizontale positie is de kans groot dat de FL geheel of gedeeltelijk verschuift.

De doka-verlichting bestond uit twee lampen van 15 Watt, voorzien van een Agfa-Gevaert-filter type R3-38004, op minimaal 70 cm afstand van de preparaten.

De preparaten werden volgens ROGERS (1979) ingesloten met glycerolgelatine (ROMEIS 1948).

Het microscopisch onderzoek van de preparaten vond plaats m.b.v. een Zeiss Photomikroskop II, vergroting circa 250x. Vanwege het hoge oplossende vermogen en de geringe scherptediepte (waardoor boven- en onderliggende korrels uit het beeld verdwijnen) is als belichtings-methode gekozen voor interferentie-contrastbelichting.

E. Opzet van de experimenten

Door gebruik te maken van de hierboven beschreven ^{14}C - en acid bubbling-technieken is het mogelijk om aan één monster zowel de POC- als de DOC-fractie te onderzoeken (HARRIS & PICCININ 1977, NALEWAJKO et al. 1976); met behulp van track-autoradiografie kan aan parallelmonsters de POC-fractie op soortsnivo onderzocht worden. Na correctie voor excretie kan, door vergelijking van de ^{14}C - met de TAR-resultaten, de betrouwbaarheid van de ^{14}C -methode geschat worden. On the invloed van het bakterioplankton op de excretiegegevens na te gaan (bak-

terieën kunnen gelabeld DOC opnemen en verademen, hetgeen zou leiden tot onderschatting van de excretie) is elke fles voor het ^{14}C -gedeelte in duplo geïncubeerd, waarbij aan de duplo antibiotica werden toegevoegd. Deze antibiotica, chloramphenicol en streptomycine (LAGARDE 1967, LEHNINGER 1976), werden zo'n drie kwartier van tevoren toegevoegd. ANDERSON & ZEUTSCHEL (1970) pasten en andere combinatie toe, nml penicilline en streptomycine (LEHNINGER 1976); ook hiermee is geëxperimenteerd.

Het hierboven beschreven experiment is voorjaar 1980 uitgevoerd. Het water, waaruit de monsters werden genomen, was vlak voor hoog tij vanaf een steiger uit het Marsdiep (Fig. 4) genomen. Dit water kan als Noordzeewater beschouwd worden. De flessen werden in een stalen rad opgehangen tussen twee steigers in de NIOZ-haven (Fig. 4), op ± 10 cm diepte. Het rad kwam gedurende het experiment geen moment in de schaduw. Incubatie vond plaats volgens het in Fig. 5 weergegeven schema. Er werden simultaan twee series uitgevoerd, één van steeds

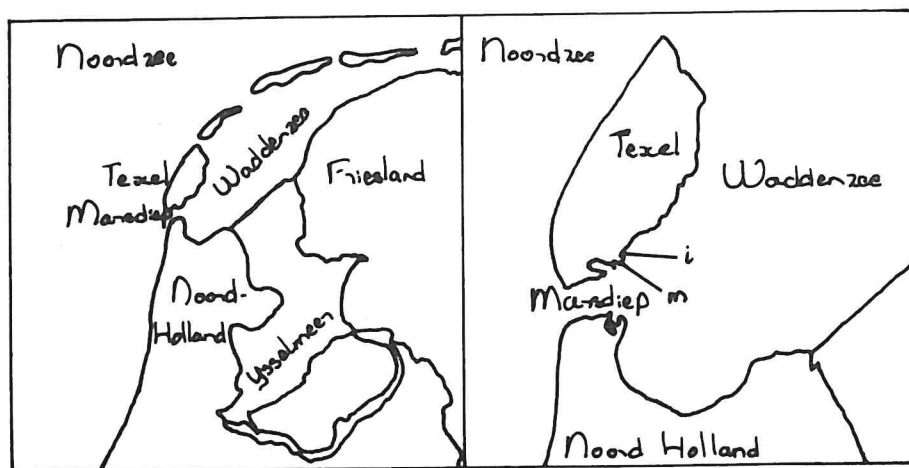


Fig. 4. Situatieschets van de monsterplaats. m = monsterplaats; i = incubatieplaats

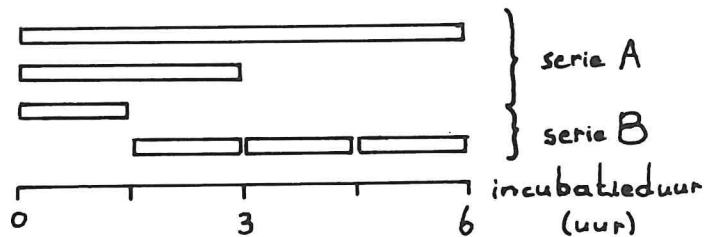


Fig. 5. Incubatieschema. Er is volgens twee methoden geïncubeerd. Een serie bestond uit incubaties die allemaal tegelijk van start gingen maar een verschillende duur hadden (serie A) en een serie bestond uit even lange incubaties die elkaar opvolgden (serie B). De eerste periode van serie B geldt tevens als (kortste) periode van serie A.

langer incubaties die tegelijk van start gingen (serie A) en één van lange incubaties die elkaar opvolgden (serie B), dit als controle op eventuele "fleseffecten" (GIESKES et al. 1979, PARKER & SAMSEL 1974, PETERSON 1977, QUASIM et. al., 1972, SAVIDGE 1978, VENRICK et al., 1977, & VERDUIN 1960). Aan het begin en einde van elke incubatieperiode werden de temperatuur van het oppervlaktewater en de Secchi-waarde ter plaatse bepaald (Tabel I). Met de Kipp-solarimeter werd de hoeveelheid licht die gedurende één incubatieperiode ingestraald was, gemeten.

Tabel I

Waarde van enkele omgevingsvariabelen tijdens het incubatie-experiment. Licht is gemeten met een Kipp solarimeter. Het was nagenoeg windstil. De flessen hingen op + 10 cm diepte. $t = 0$ op 9 uur zomertijd. Opp. temp. = watertemperatuur aan de oppervlakte. Secchi w. = Secchi waarde; - = groter dan waterdiepte ter plaatse.

Incubatie (t)	Licht (10^4 kJ.m^{-2})	Incubatie (t)	Opp. temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Secchi w. (m)
0 - 1½	2,5	0	14,5	-
1½ - 3	1,8	1½	15,0	-
3 - 4½	1,9	3	15,0	4,0
4½ - 6	1,6	4½	15,0	3,5
		6	15,5	2,5

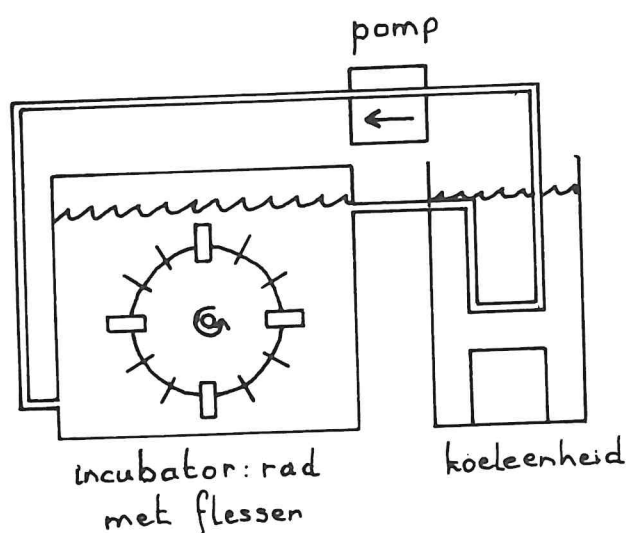


Fig. 6. Schematische weergave van de incubator.

De eerste 10 ml van de monsters werd zonder onderdruk afgefiltreerd en voor de excretie-bepaling gebruikt, de rest werd met een onderdruk van hooguit 100 mm kwikdruk gefiltreerd. Het filter werd gebruikt voor de POC-bepaling, de rest van het filtraat werd weggegooid. Voor TAR werd gebruik gemaakt van de parallelmonsters, omdat de ^{14}C -concentraties die bij de ^{14}C -methode gangbaar zijn, veelal te hoog zijn voor TAR: er ontstaan teveel tracks per cel die dan moeilijk of niet meer uit elkaar te houden zijn. Voor de berekening van de juiste concentratie is gebruik gemaakt van de formule (KNOECHEL & KALFF 1979):

$$^{14}\text{C} = 0,67 \times \text{DIC} \times V \times T^{-1}$$

en ^{14}C = aantal μCi per monster

DIC = Dissolved Inorganic Carbon in
mg koolstof. 1^{-1}

V = volume van het monster in l

T = incubatieduur in uur

In de loop van het onderzoek zijn verschillende pilotexperimenten uitgevoerd. Hierbij werd gebruik gemaakt van een incubator (Fig. 6). In plaats van met Noordzeewater werd er bij deze experimenten gewerkt met cultures van de alg *Dunaliella tertiolecta*.

V. RESULTATEN EN DISCUSSIE

A. Invloed van incubatiemethode, excretie en bakterioplankton

Er is één incubatie-experiment, als hiervoor beschreven, uitgevoerd. De hoeveelheid gedurende een incubatieperiode ingestraald licht aan het wateroppervlak (in J.cm^{-2}), de oppervlaktetemperatuur ($^{\circ}\text{C}$) en de Secchiwaarde (m) aan het begin en/of einde van een periode staan vermeld in Tabel 1. De resultaten van dit experiment voor wat betreft de POC- en DOC-fractie zijn weergegeven in Fig. 7. Uit deze figuur blijkt dat er excretie van DOC optreedt maar dat het in vergelijking met de POC-waarden verwaarloosbaar (minder dan 1 %) is (BERMAN & HOLM HANSEN 1974, HARRIS & PICCININ 1977, SHARP 1978).

Eventuele verschillen tussen monsters met en zonder antibiotica zijn vanwege de lage waarden niet aantoonbaar. In de POC-fractie zijn de verschillen aanzienlijk: de waarden van monsters met antibiotica liggen zo'n 50 % onder die van monsters zonder. Hieruit valt te concluderen dat de antibiotica in deze concentraties en samenstelling een remmende invloed hebben op de ^{14}C -fixatie in de POC-fractie, dit in tegenstelling tot wat LAGARDE (1967) vond. Het verschil wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een andere soortensamenstelling, en dus een andere gevoeligheid voor antibiotica, van het monster: LAGARDE (1967) werkte met diatomeeën. Deze kwamen in

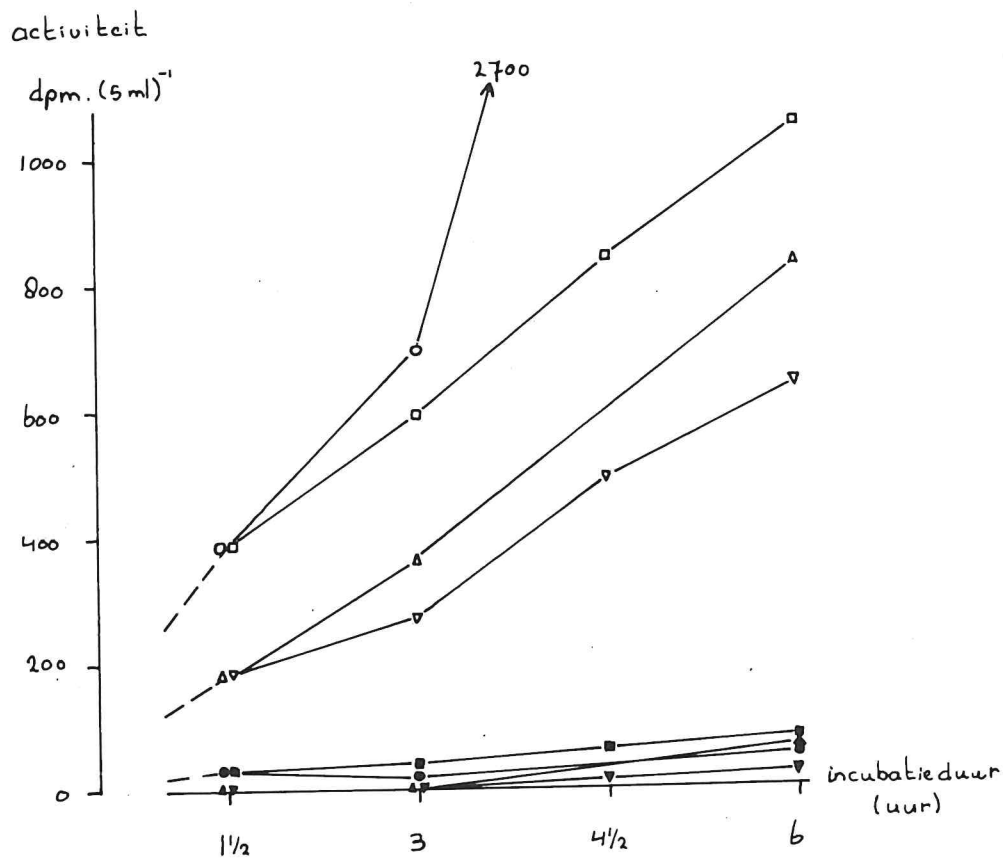


Fig. 7. Verloop van POC- en DOC-concentraties in de tijd, gemeten volgens twee incubatie methoden, de normale en de cumulatieve methode (serie A resp. serie B, zie tekst), met duplo's waaraan antibiotica toegevoegd waren. Open symbolen: filter- oftewel POC-waarden, gesloten symbolen: filtraat- oftewel DOC-waarden. o/● = serie A, zonder antibiotica; Δ/▲ = serie A, mét; □/■ = serie B, zónder; ▽/▼ = serie B, met antibiotica. NB: de in deze figuur weergegeven waarden zijn licht- minus donkerwaarden.

Tabel III

Afzonderlijke licht- en donkerwaarden van het incubatie-experiment, uitgedrukt in dpm (desintegrations per minute) per 5 ml doorgestroomd monster, dit om vergelijking tussen filter- en filtraatwaarden mogelijk te maken. Elke "100 ml-fles" bevatte 135 ml monster. Incubatie vond plaats in situ, met Noordzee-water.

Incubatie- periode (uur)	Zonder antibiotica				Met antibiotica			
	Filter		Filtraat		Filter		Filtraat	
	Licht	Donker	Licht	Donker	Licht	Donker	Licht	Donker
0 - 1½	401	16	54	27	198	20	10	24
1½ - 3	227	19	33	20	107	15	14	20
3 - 4½	272	20	23	2	230	11	13	2
4½ - 6	219	9	22	7	155	7	13	5
0 - 3	705	11	23	5	369	11	13	7
3 - 6	2722	22	57	4	854	17	67	4

onze monsters nagenoeg niet voor. Toedienen van antibiotica zoals opgegeven door ANDERSON & ZEUTSCHEL (1970) geven eenzelfde beeld (Tabel III), remming van de ^{14}C -fixactie, hoewel ITURRIAGSA & HOPPE (1977) het tegenovergestelde beweren. Het verschil in resultaten tengevolge van de incubatiemethode tenslotte is duidelijk; alleen tegenovergesteld aan het verwachte (GIESKES et al. 1979, PETERSON 1977, SAVIDGE 1978). De resultaten van serie A (de "normale" methode) liggen boven die van serie B (de "cumulatieve" methode). Zeer duidelijk komt dit naar voren wanneer de relatieve verschillen (= de ratio van serie A en serie B (SAVIDGE 1978)) worden vergeleken (Tabel II). Een mogelijke verklaring is dat de algen door de behandeling een tijdelijke terugslag ondervinden in hun opnamesnelheid. In de resultaten van serie B zit deze terugslag ("lagfase") meerder keren verwerkt, in die van serie A daarentegen slechts één maal. Dit impliceert dat zeer korte incubatie niet altijd een betrouwbare maat voor de BPP geven. Nader onderzoek met zulke incubatieperioden zou hier opheldering kunnen verschaffen. Met deze werkwijze blijft het echter

Tabel II

Relatieve verschillen tussen productiewaarden, verkregen met de normale incubatiemethode (een serie van steeds langer wordende incubaties die allemaal tegelijk starten) en productiewaarden verkregen met de cumulatieve methode (even lange incubaties die elkaar opvolgen), weergegeven als normaal gedeeld door cumulatief; vergelijking van eigen data met die van andere auteurs.

Incubatie duur (uur)	GIESKES et al. (1979)	SAVIDGE (1978)	Eigen data
2	0,8		
3			1,2
4	0,5		
6	0,5	0,7	2,8

behelpen: het systeem in de fles is en blijft een black box. Fundamenteel fysiologisch onderzoek zou meer op z'n plaats zijn. Het verschil in resultaat met de overige auteurs kan gelegen zijn in het feit dat zij met oceanische monsters hebben gewerkt, terwijl in dit onderzoek monsters uit de Noordzee zijn gebruikt. De in Figuur 7 weergegeven waarden zijn licht-minus donkerwaarden. Deze waarden worden dikwijls opgevat als maat voor de NPP: in de lichtwaarde zitten allerlei (?) niet lichtgebonden effecten verwerkt, waarvoor met de donkerwaarde wordt gecompenseerd. Duidelijk is dit echter in het geheel nog niet (PETERSON 1979, ANON. 1980). Beide publicaties geven als voorlopige oplossing de raad om ook de afzonderlijke licht- en donkerwaarden te vermelden. Dit advies is hier opgevolgd (Tabel III).

B. Track-autoradiografie

1. Methode

De monsters voor track-autoradiografie werden geconcentreerd d.m.v. centrifugeren. Hierbij werd een twee fasen-systeem toegepast, water en sorbitol. Twee zaken zijn hierbij van belang: komen de algen kwantitatief in de sorbitolfractie terecht, en: tast het medium de hechtkracht van de gecoate preparaatglaasjes niet aan. Met de hier gevolgde werkwijze kwam *Phaeocystis poucheti*, een kolonievormende alg, in het geheel niet in de sorbitolfractie terecht, ze bleven a.h.w. drijven op de sorbitol; kleine flagellaten bleven min of meer gelijkelijk verspreid over beide fracties. Deze werkwijze voldoet dus niet wanneer men het hele systeem wil onderzoeken. Opvoeren van de centrifugetijd en -snelheid zou kunnen helpen.

Aan de tweede eis, het niet aantasten van de hechtkracht van de preparaatglaasjes, werd ook niet voldaan: tijdens ontwikkelen liet de FL precies boven de plaats waar de algen, in het sorbitolmengsel, opgebracht waren volledig los. Doordat het losgelaten deel van de FL uitrekte, er vormde zich een "bel", en soms zelfs losscheurde van de rest, konden de FL aanwezige tracks niet meer gecorreleerd worden met op het preparaatglas aanwezige algen.

Het aanbrengen van de FL dient zodanig te geschieden dat een egale laag van reproduceerbare dikte wordt verkregen (ROGERS 1979). De dip-methode echter leverde èn geen egale laag èn geen reproduceerbare dikte (DESCOLAS-GROS 1980). De belangrijkste oorzaak was dat de emulsie na terugbrengen op kamertemperatuur (vanaf 42 °C, om te smelten) inhomogeen werd, "uitzakte". Bij de druppelmethode hoefde de emulsie niet afgekoeld te worden. Een nadeel van deze methode was echter de

veel langere bewerkingsduur, zo'n 8 uur, veroorzaakt doordat de FL dikker was. Met enig experimenteerwerk (aanlengen van de emulsie, een kleiner volume opbrengen, uitstrijken van de emulsie) moet het mogelijk zijn om de laagdikte terug te brengen van 60 μ tijdens de belichtingsfase tot het minimum dat voor ^{14}C vereist is, dat is (bij Ilford G5) 25 μ (LEVI et al. 1963, ROGERS 1979). De bewerkingsduur, die vooral afhangt van de dikte van de FL, kan zo aanzienlijk gereduceerd worden.

De wijze van drogen van de gestolde FL bleek uitermate belangrijk voor een goed resultaat. Te hard drogen (lang drogen, veel silica-gel en/of hoge temperatuur) veroorzaakt barsten in de FL. Langs deze barsten treedt zwarting op waardoor ze ook met het blote oog waarneembaar zijn. Bovendien neemt de achtergrond in de bovenste lagen van de FL enorm toe; de preparaten krijgen een bruinig voorkomen. Bij deze preparaten zijn de planktonorganismen niet meer goed waar te nemen. Niet genoeg drogen kan tot gevolg hebben dat er zwarte golfpatronen op het preparaat ontstaan. De emulsie blijft dan waarschijnlijk slap waardoor ze zeer gevoelig is voor stoten. Bij het werken met een FL-dikte van meer dan 50 μ is een speciaal droogapparaat (ROGERS 1979) dan ook zeker aan te bevelen.

Tijdens ontwikkelen doorloopt een preparaat verschillende baden. Deze baden dienen alle strikt dezelfde temperatuur te hebben (ROGERS 1979). Een punt waar hierbij op gelet moet worden is de roermotor. De motor geeft warmte af; een bad dat anderhalf uur op zo'n motor staat kan hierdoor een aantal graden opgewarmd worden. Volgens ROGERS (1979) kan door plotselinge temperatuurovergangen de FL loslaten van het preparaat. Waarschijnlijk valt dat wel mee: bij de druppelmethode worden preparaten van een bad van 5 °C naar een van 20 ° overgebracht,

zonder nadelige gevolgen.

Bij een van de experimenten liet de FL in zijn geheel los tijdens ontwikkelen. Het is mogelijk dat de coating te oud was (ruim een maand) hoewel ROGERS (1979) adviseert om grote aantallen preparaten in één keer te coaten, m.a.w. verouderen niet als een gevaar ziet. Een andere mogelijke oorzaak is dat de coating te dik was.

2. RESULTATEN

In een pilot-experiment werden cellen van *Dunaliella tertiolecta* gedurende 1 uur geïncubeerd. Het opbrengen van de emulsie gebeurde met de druppelmethode. Het gemiddeld aantal tracks (Fig. 8) per cel over 100 cellen was $1,0 \pm 0,1$ (betrouwbaarheidsinterval: $(m \times n^{-1})^{\frac{1}{2}}$ (DESCOLAS-GROS 1980)). Volgens de formule (KNOECHEL & KALFF 1976b):

$$^{14}\text{C}_{\text{fix}} = \frac{2 \times m}{0,86 \times 0,98 \times 60} \text{ dpm.cel}^{-1}$$

en $^{14}\text{C}_{\text{fix}}$ = hoeveelheid ^{14}C die tijdens incubatie gefixeerd is,

m = gemiddeld aantal tracks per cel per uur belichting,

2, 0,86 en 0,98 = correctiefactoren (zie KNOECHEL & KALFF 1976b),

60 = omrekeningsfactor: aantal tracks veroorzaakt door een bron die 1 desintegratie per minuut (dpm) levert, een uur lang,

betekent dit dat er 5,5 dpm per cel per uur opgenomen is, i.e., bij een specifieke activiteit van $40 \mu\text{Ci.mmol}^{-1}$, $8,6 \cdot 10^{-14} \text{ mg } ^{14}\text{C.cel}^{-1}.\text{uur}^{-1}$ (1). In het water rondom de cel is aanwezig 0,25 ml ^{14}C -oplossing, met een sterkte van $4,5 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$, op

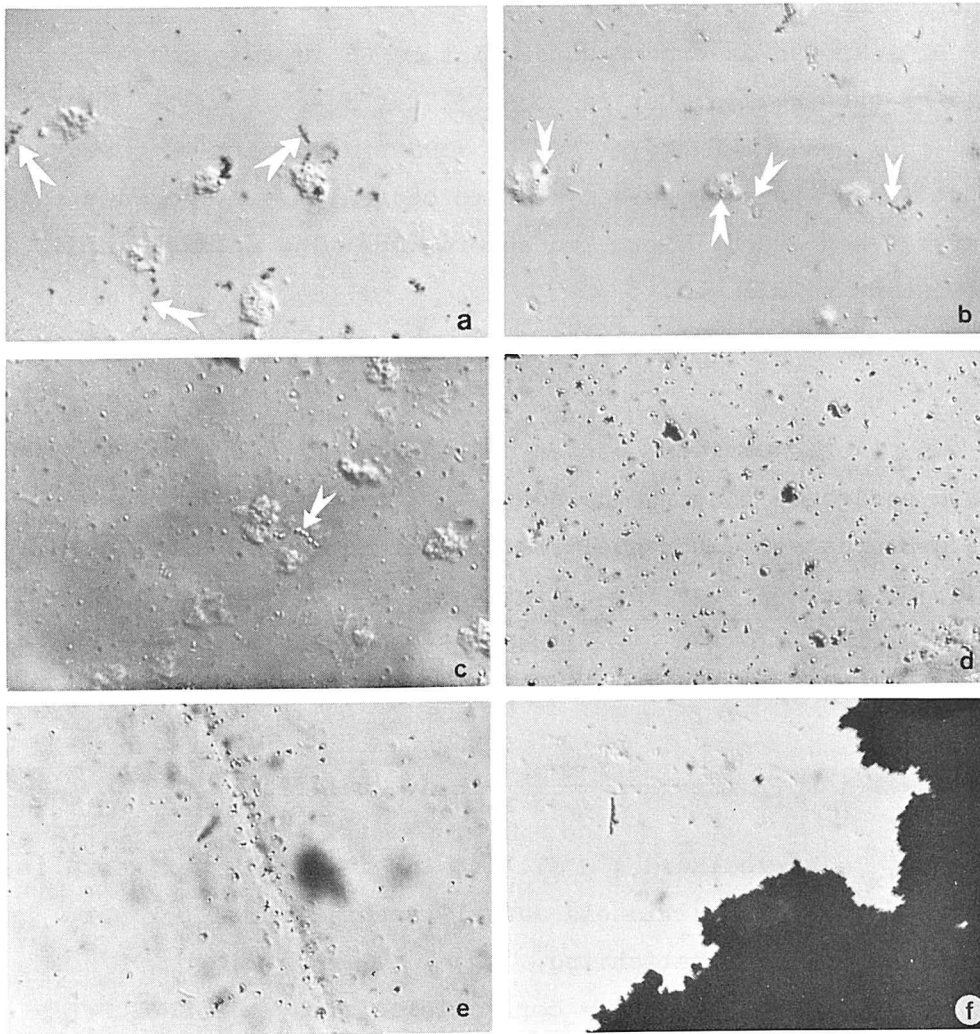


Fig. 8. Track-autoradiogram. Algen van de soort *Dunaliella tertiolecta* zijn 1 uur geïncubeerd. De emulsie is opgebracht volgens de druppel-methode. Belichting: 48 uur. Vergroting: $\pm 250 \times$; interferentie-contrast belichting. Figs. 8a-c: voorbeelden van algen met tracks. Fig. 8d: verhoogde achtergrond aan de oppervlakte van de FL. Fig. 8e: concentratie van zilverkorrels aan de randen van een barst in de FL. Fig. 8f: rand van een concentratie zilverkorrels, veroorzaakt door stoten tegen het preparaat.

een volume van 70 ml monster. De ^{14}C -concentratie in het water is dus $5,6 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$ (2). De ^{12}C -concentratie is gesteld op 25 mg.l^{-1} (3) (STRICKLAND 1966).

Met de verhouding $^{12}\text{C}/^{14}\text{C}$ van de omgeving ((3) resp. (2)) kan uit de hoeveelheid ^{14}C die de alg opgenomen heeft (1) de hoeveelheid opgenomen ^{12}C berekend worden:

$$^{12}\text{C}_{\text{opg}} = (^{12}\text{C}/ ^{14}\text{C})_{\text{omg}} \times 1,06 \times ^{14}\text{C}_{\text{opg}}$$

en opg = door de cel opgenomen

omg = aanwezig in het milieu van de cel

1,06 = isotoopdiscriminatiefactor (HARRIS 1978).

Volgens deze berekening is de opname van ^{12}C , m.a.w. de BPP (hierbij is aangenomen dat de cel zich nog in fase 1 bevindt, zie Inleiding), gelijk aan $4 \cdot 10^{-1} \text{ mg}$ koolstof per cel per uur. Om een idee te verkrijgen omtrent de correctheid van deze waarde is de koolstofconsumptie van de cel eveneens op een andere manier, die onafhankelijk is van die hierboven weergegeven, berekend. Daarbij is uitgegaan van de hoeveelheid koolstof die een cel bevat en de tijd waarin een culture zich verdubbelt. De door ons gebruikte alg *Dunaliella tertiolecta* heeft een diameter van 8 tot 10 μ , en is daarmee qua volume ongeveer vergelijkbaar met de alg *Rhodomonas spec.* (diameter 10 - 12 μ). Deze alg bevat circa 20 pg koolstof per cel (HAGMEIER 1961). De tijd waarin een culture van *D. tertiolecta* zich verdubbelt is 2 dagen (pers. Comm. KLEIN BRETELER). Stellen we dus de koolstofinhoud van *D. tertiolecta* op 20 pg.cel^{-1} dan moet een cel om zich te verdubbelen datzelfde gewicht aan koolstof opnemen. De cel moet dus in 2 dagen = 48 uur 20 pg koolstof opnemen, dat is $4 \cdot 10^{-10} \text{ mg C.cel}^{-1} \cdot \text{uur}^{-1}$. Welnu: deze waarde is gelijk aan de waarde die gevonden is op grond

van track-tellingen; de conclusie dat track-autoradiografie leidt tot correcte resultaten, zoals ook KNOECHEL & KALFF (1976b) aantoonde, lijkt dan ook gerechtvaardigd.

3. CONCLUSIES

We kunnen concluderen dat autoradiografie in het algemeen en track-autoradiografie in het bijzonder een methode is waaraan vele, vooral technische problemen kleven. Fixeren van het monster, concentreren, een egale en reproduceerbare laag verkrijgen en op de juiste wijze drogen van de met emulsie bedekte preparaten zijn enkele van deze problemen. Bij track-autoradiografie komt daar nog eens de factor tijd bij, vanwege de lange ontwikkeltijd en het grote aantal replica-preparaten (KNOECHEL & KALFF 1979, PEARL & STULL 1979). Toch menen wij dat bij kwantitatieve toepassingen deze methode de voorkeur verdient boven zijn variant, grain density-autoradiografie, omdat het feit dat achtergrond nagenoeg ontbreekt van essentieel belang is voor een correcte interpretatie van autoradiogrammen.

Voor nader onderzoek naar de haalbaarheid van track-autoradiografie bij de bepaling van de primaire productie in een waterig milieu is het in het bijzonder aan te bevelen om meer kennis te vergaren omtrent de fysische eigenschappen van fotografische emulsies. BARKAS (1963, 1973) lijkt voor dit doel erg geschikt.

VI. LITERATUUR

- AARONSON, S., 1978. Excretion of organic matter by phytoplankton in vitro.—*Limnol. Oceanogr.* 23 (4): 838.
- ANDERSON, G.C. & R.P. ZEUTSCHER, 1970. Release of dissolved organic matter by marine phytoplankton in coastal and offshore areas of the northeast Pacific Ocean.—*Limnol. Oceanogr.* 15 (3) : 402-407.
- ARTHUR, C.R. & F.H. RIGLER, 1967. A possible source of error in the ^{14}C -method of measuring primary productivity.—*Limnol. Oceanogr.* 12 (1): 121-124.
- BARKAS, W.H., 1963. Nuclear research emulsions. A treatise in two volumes. Academic Press, New York/London. Pure and applied physics, vol. 15. Volume I: Techniques and Theory: 1-518.
- , 1973. Nuclear research emulsions. A treatise in two volumes. Academic Press, New York/London. Pure and applied physics, vol. 15. Volume II: Particle behaviour and emulsion applications: 1-562.
- BARNETT, A.M. & J. HIROTA, 1967. Changes in the apparent rate of ^{14}C -uptake with length of incubation period in natural phytoplankton populations.—*Limnol. Oceanogr.* 12 (2): 349-353.
- BERMAN, T., 1975. Size fractionation of natural aquatic populations associated with autotrophic and heterotrophic carbon uptake.—*Mar. Biol.* 33 (3): 215-220.
- BERMAN, T. & O. HOLM-HANSEN, 1974. Release of photoassimilated carbon as dissolved organic matter by marine phytoplankton.—*Mar. Biol.* 28 (4): 305-310.
- BROCK, T.D., P. REMINGTON & W.A. DOEMEL, 1975. Photochemical activity of single blue-green algal cells recorded by the use of nuclear track emulsion.—*Photosynthetica* 9: 331-332.
- BRUIN, M. de, 1978. Straling en stralingsdetectie. Interuniversitair Reactor Instituut, Delft. pp. 1-150.
- BUCKINGHAM, S., C.J. WALTERS & P. KLEIBER, 1975. A procedure for estimating gross production, net production and algal carbon content using ^{14}C .—*Verh. Internat. Verein. Limnol.* 19: 32-28.
- CONOVER, R.J. & V. FRANCIS, 1973. The use of radioactive isotopes to measure the transfer of materials in aquatic food chains.—*Mar. Biol.* 18: 272-283.
- COULON, C. & V. ALEXANDER, 1972. A sliding-chamber phytoplankton settling technique for making permanent quantitative slides with applications in fluorescent microscopy and autoradiography.—*Limnol. Oceanogr.* 19: 149-152.
- DERENBACH, J.B. & P.J. LeB. WILLIAMS, 1974. Autotrophic and bacterial production: fractionation of plankton populations by differential filtration of samples from the English Channel.—*Mar. Biol.* 25 (4): 263-269.
- DESCOLAS-GROS, C., 1980. Use of track-autoradiography in oceanography: evaluation of phytoplankton species productivity.—*J. Plankton Res* 2 (1): 23-32.
- GACHTER, R. & A. MARES, 1979. Comments on the acidification and bubbling method for determining phytoplankton production.—*Oikos* 33 (1): 69-73.
- GIESKES, W.W.C., G.W. KRAAIJ & M.A. BAARS, 1979. Current ^{14}C -methods for measuring primary production: gross underestimates in oceanic waters.—*Neth. J. Sea Res.* 13 (1): 58-78.
- HAGMEIER, E., 1961. Plankton-Äquivalente.—*Kieler Meeresforsch.* 17: 32-47.

- HARRIS, G.P., 1978. Photosynthesis, productivity and growth: the physiological ecology of phytoplankton.—Archiv für Hydrobiologie, Beiheft 10.
- HARRIS, G.P., & B.B. PICCININ, 1977. Photosynthesis by natural phytoplankton.—Arch. Hydrobiol. 80 (4): 405-457.
- HERBLAND, A., 1975. Utilisation par la flore hétérotrophe de la matière organique naturelle dans l'eau de mer.—J. exp. mar. Biol. Ecol. 19 (1): 19-31.
- HOBSON, L.A., W.L. MORRIS & K.T. PIRQUET, 1976. Theoretical and experimental analysis of the ^{14}C technique and its use in studies of primary production.—J. Fish Res. Board Can. 33 (8): 1715-1721.
- HOLLIBAUGH, J.T., J.A. FUHRMAN & F. AZAM, 1980. Radioactivity labeling of natural assemblages of bacterioplankton for use in trophic studies.—Limnol. Oceanogr. 25 (1): 172-181.
- HOPPE, H.-G., 1978. Relations between active bacteria and heterotrophic potential in the sea.—Neth. J. Sea Res. 12 (1): 78-98.
- ILMAVIRTA, V. & R.J. JONES, 1977. Factors affecting the ^{14}C -method of measuring phytoplankton production.—Ann. Bot. Fennici 14: 97-101.
- ITURRIAGSA, R. & H.-G. HOPPE, 1977. Observations of heterotrophic activity on photoassimilated organic matter.—Mar. Biol. 40: 101-108.
- IWAARDEN, A.J.W. van, 1979. Micro autoradiografische bepaling van de primaire productie van de verschillende fytoplanktonsoorten tijdens de voorjaarsbloei (1979) in het Grevelingenmeer.—Studentenverslag Delta Instituut voor Hydrobiologisch Onderzoek D9-1979.
- JASSBY, A.D. & C.R. GOLDMAN, 1974. Loss rates from a lake phytoplankton community.—Limnol. Oceanogr. 19 (4): 618-627.
- JOIRIS, C., 1977. On the role of heterotrophic bacteria in marine ecosystems: some problems.—Helgoländer wiss. Meeresunters. 30: 611-621.
- KNOECHEL, R. & J. KALFF, 1976a. The applicability of grain density autoradiography to the quantitative determination of algal species production: a critique.—Limnol. Oceanogr. 21 (4): 583-590.
- , 1976b. Track autoradiography: a method for determination of phytoplankton species production.—Limnol. Oceanogr. 21 (4): 590-596.
- , 1979. The advantages and disadvantages of grain density and track autoradiography.—Limnol. Oceanogr. 24 (6): 1170-1171.
- LACARDE, E., 1967. Utilisation des antibiotiques dans la réalisation des cultures de foraminifères sous faible volume.—Vie et Milieu, série A, 18 (1-A): 27-35.
- LARSSON, U. & A. HAGSTRÖM, 1979. Phytoplankton exudate release as an energy source for the growth of pelagic bacteria.—Mar. Biol. 52: 199-206.
- LEAN, D.R.S. & B.K. BURNISON, 1979. An evaluation of errors in the ^{14}C -method of primary production measurement.—Limnol. Oceanogr. 24 (5): 917-928.
- LEHNINGER, A.L., 1976. Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function. Second edition. Worth Publishers, Inc.
- LEVI, H., A.W. RODGERS, M.W. BENTZON & A. NIELSEN, 1963. On the quantitative evaluation of autoradiograms.—Mat. Fys. Medd. Dan. Vid. Selsk. 33 (11): 1-51.
- LUND, J.W.G., C. KIPLING & E.D. LECREN, 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of

- estimations by counting.—*Hydrobiologia* 11: 143-170.
- MAGUE, T.H., E. FRIBERG, D.J. HUGHES & I. MORRIS, 1980. Extracellular release of carbon by marine phytoplankton: a physiological approach.—*Limnol. Oceanogr.* 25 (2): 262-279.
- MOMMAERTS, J.B., 1972. Autoradiography as a tool in primary production research.—*Neth. J. Sea Res.* 5 (4): 437-439.
- NALEWAJKO, C., T.G. DUNSTALL & H. SHEAR, 1976. Kinetics of extracellular release in axenic algae and in mixed algal-bacterial cultures: significance in estimation of total (gross) phytoplankton excretion rates.—*J. Phycol.* 12 (1): 1-5.
- PARKER, B.C. & G.L. SAMSEL, 1974. A "container effect" on ^{14}C primary production measurements.—*Trans. Kentucky Acad. Sci.* 35 (1-2): 9-16.
- PEARL, H.W. & E.A. STULL, 1979. In defense of grain density autoradiography.—*Limnol. Oceanogr.* 24 (6): 1166-1169.
- PELE, S.R., 1972. Theory of autoradiography. In: P.B. GAHAN. *Autoradiography for biologists*. N.Y. Academic Press Inc., New York. pp 1-17.
- PETERSEN, G.H. 1979. On the analysis of dark fixation in primary production computations.—*J. Cons. int. Explor. Mer* 33 (7): 336-339.
- PETERSON, B.G. 1977. Radiocarbon uptake: its relation to net particulate carbon production.—*Limnol. Oceanogr.* 23 (1): 179-184.
- POMEROY, L.R., 1974. The ocean's foodweb, a changing paradigm.—*Bio-science* 24 (9): 499-504.
- PRICE, C.A., E.M. REARDON & R.R.L. GUILLARD, 1978. Collection of dinoflagellates and other marine microalgae by centrifugation in density gradients of a modified silica sol.—*Limnol. Oceanogr.* 23 (3): 548-553.
- PUGH, P.R., 1973. An evaluation of liquid scintillation counting techniques for use in aquatic primary production studies.—*Limnol. Oceanogr.* 18 (2): 310-318.
- QUASIM, S.Z., P.M.A. BHATTATHIRI & V.P. DEVASSY, 1972. Some problems related to the measurement of primary production using radiocarbon technique.—*Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 57 (4): 535-549.
- ROGERS, A.W., 1979. *Techniques of autoradiography*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam/New York/Oxford. Third completely revised edition.
- ROMEIS, B., 1948. *Mikroskopische Technik*. R. Oldenbourg, München. 15. verbesserte Auflage.
- SALONEN, K. & A. HOLOPAINEN, 1979. A comparison of methods for the estimation of phytoplankton primary production.—*Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 64 (1): 147-155.
- SANFORD, G.R., A. SANDS & C.R. GOLDMAN, 1969. A settle-freeze method for concentrating phytoplankton in quantitative studies.—*Limnol. Oceanogr.* 14 (5): 790-794.
- SAVIDGE, G., 1978. Variations in the progress of ^{14}C uptake as a source of error in estimates of primary production. *Mar. Biol.* 49: 295-301.
- SCHINDLER, D.W., R.V. SCHMIDT & R.A. REID, 1972. Acidification and bubbling as an alternative to filtration in determining phytoplankton production by the ^{14}C -method.—*J. Fish. Res. Bd. Can.* 29: 1627-1631.
- SHARP, J.H., 1977. Excretion of organic matter by marine phytoplankton: do healthy cells do it?—*Limnol. Oceanogr.* 22 (3): 381-399.

- , 1978. Reply to comment by S. Aaronson.—*Limnol. Oceanogr.* 23 (4): 839-840.
- SHELDON, R.W., 1972. Size separation of marine seston by membrane and glass-fiber filters.—*Limnol. Oceanogr.* 17 (3): 494-498.
- SIEBURTH, J.McN., V. SMETACEK & J. LENZ, 1978. Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions.—*Limnol. Oceanogr.* 23 (6): 1256-1263.
- SILVER, M.W. & P.J. DAVOLL, 1978. Loss of ^{14}C -activity after chemical fixation of phytoplankton: error source for autoradiography and other productivity measurements.—*Limnol. Oceanogr.* 23 (2): 362-368.
- STEEMANN NIELSEN, E., 1952. The use of radio-active carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea.—*J. Cons.* 18 (1): 117-140.
- , 1977. The carbon-14 technique for measuring primary production by plankton algae. A report on the present knowledge.—*Folia Limnol. Scand.* 17: 45-48.
- STRASKRABOVA, V. & J. KOMARKOVA, 1979. Seasonal changes of bacterioplankton in a reservoir related to algae. I. Numbers and biomass.—*Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 64 (3): 285-302.
- STRICKLAND, J.D.H., 1966. Measuring the production of marine phytoplankton.—*Bull. Fish. Res. Bd. Can.* no. 122.
- THEODORSSON, P.J. & J.O. BJARNASON, 1975. The acid bubbling method for primary productivity measurements modified and tested.—*Limnol. Oceanogr.* 20 (6): 1018-1019.
- VENRICK, E.L., J.R. BEERS & J.F. HEINBOKEL, 1977. Possible consequences of containing microplankton for physiological rate measurements.—*J. exp. mar. biol. evol.* 26 (1): 55-76.
- VERDUIN, J., 1960. Phytoplankton communities of western Lake Erie and the CO_2 and O_2 changes associated with them.—*Limnol. Oceanogr.* 5: 372-380.
- VOLLENWEIDER, R.A. (ed.), 1974. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. Blackwell Scientific Press, Oxford, Edinburgh, IBP Handbook 23. 2nd edition.
- WATT, W.P., 1971. Measuring the primary production rates of individual phytoplankton species in natural mixed populations.—*Deep Sea Res.* 18 (3): 329-339.
- WIEBE, W.J. & D.F. SMITH, 1977. Direct measurement of dissolved organic carbon release by phytoplankton and incorporation by microheterotrophs.—*Mar. Biol.* 42: 213-223.
- WILLIAMS, P.J. LeB., T. BERMAN & O. HOLM-HANSEN, 1972. Potential sources of error in the measurement of low rates of planktonic photosynthesis and excretion.—*Nature New Biology* 236: 91-92.
- ANONYMUS
- ANON. Report on the working group on primary production methodology. Texel, 23-25 June 1980. Biological Oceanography Committee, ICES. C.M. 1980/L:57.
- ANON. Photographic emulsions for nuclear research. Ilford Technical Information Sheet Y44.1. L68. Printed in England.