Een methode ter bepaling van de respiratieaktiviteit in marien plankton

door

R.H.D. Lambeck

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN:

nummer 1973 - 12

13164

Een methode ter bepaling van de respiratieaktiviteit in marien plankton

door

R.H.D. Lambeck

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN:

nummer 1973 - 12

Rechten voorbehouden

Van interne verslagen zijn nadruk of aanhalingen slechts toegestaan met uitdrukkelijke toestemming van het NIOZ.

Een methode ter bepaling van de respiratieaktiviteit in marien plankton

door

R.H.D. Lambeck

Intern verslag

over

werkzaamheden verricht als doktorale studie
in het tijdvak september 1972 - maart 1973

aan

het NIOZ op Texel

voor

Prof. Dr. G.P. Baerends
Zoölogisch Laboratorium
Rijks Universiteit Croningen
onder supervisie van
Drs. J.H. Vosjan

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN:

nummer 1973 - 12

Een methode ter bepaling van de respiratieaktiviteit in marien plankton

door

R.H.D. Lambeck

Inhoud:

I. Summary 1
Samenvatting 3
II. Inleiding 6
III. Doel van het onderzoek 21
IV. Materiaal en methode 22
A. Chemicaliën 22
B. Filtratieproces 25
C. Homogenisatiemethodiek 27
D. INT reduktie 31
E. Bepaling formazanextinktie 32
F. Ijking INT - oplossing 37
G. Gilson Respirometer 38
V. Resultaten 40
A. Homogenisatieproeven 40
B. Ijking INT 48
C. Vergelijking methode Packard en Gilson Respirometer 49
VI. Diskussie 52
VII. Litteratuur 67

I. SUMMARY

The usefulness of a method, described by T.T. PACKARD (1971), for the determination of the potential respiratory rate in marine plankton, based on the use of a tetrazolium dye, was tested. Especially the influence of a few aspects of the homogenization procedure on the final results was investigated.

A detailed description of the determinationtechnique is given, with some adjustments of the original method.

It appeared to be impossible, like PACKARD, to homogenize with a Teflon-glass homogenizer; perhaps a wrong type has been used. After testing a few other possibilities, the convential Potter tube with a glass pestle gave the best results. There were no differences

in homogenization efficiency between the individual tubes. It was checked, whether the number of up-and-down movements of the tube along the pestle after the initial disruption of the glass-fiber filter influenced the results. In the range from four to sixteen times this appeared not to be the case.

The variability in activity between samples of the same seawater amounts to 11.3 $\pm$ 5.2% of the mean value. The share of the procedure after homogenization, determined by the difference between the duplicates of each sample as a percentage of their mean, amounts to 3.3 $\pm$ 3.0%.

If the pottertubes are used more than fifteen times, the variability and its variancy showed a significant increase. It is probable that there is a drop in homogenization efficiency too, but this cannot be proved from this results, because the daily seawater samples are not comparable.

An extra one minute ultrasonic treatment gave an activity increase of 9%, but it did not improve the variability. The last point is in accordance with the results of a chlorophyll determination : extraction by homogenizing the material in a pottertube with a 90% acetone solution gave 16% higher value than a 5 minute ultrasonic desintegration. So the last one is less effective in algal cellhomogenization. The 9% increase is probably due to disruption of (a part of) the bacterial population.

Homogenization in pottertubes, even in new ones, is not complete. Especially small algal species ($<5\mu$) with a rather firm cellwall, f.e. Scenedesmus sp., survive for an important part : according to a rough estimation 20%. It is recommended to test a homogenization procedure with glass beads to see whether these problems can be overcome.

Electro-chemical standardization of the INT-solution gave rather good results. Some irregularities will perhaps disappear after repairing a fault in the anode-cell construction.

A comparisontest between a conventional method of oxygen-consumption determination, the Gilson differential respirometer (manometric) and the Packardmethod was made by determining the respiration of a 2 ml concentrated Chlamydomonasculture. They gave 3.2 and 11.6 μl O_2-consumption/hr respectively. The higher value in the last one is to be expected, because the Packard-method determines the potential rate. Because cell-disruption is not complete, the true value might be higher.

This method is very sensitive and has a good reproducability, so in principle it is very useful. But the homogenization has to be improved, so that it becomes independent of the plankton composition and wear. Besides, the correlation between potential and in situ respiration has to be researched, before the results can be interpreted.

SAMENVATTING

De bruikbaarheid werd getest van een methode ter bepaling van de potentiële respiratiesnelheid in marien plankton, beschreven door T.T. PACKARD (1971), welke gebaseerd is op het gebruik van een tetrazoliumzout. Speciaal de invloed van een aantal aspekten der homogenisatie van een glasvezelfilter met residu op de uiteindelijke aktiviteitswaarde werd onderzocht.

Een gedetailleerde beschrijving van de uitvoering der bepalingen wordt gegeven. Op een aantal punten is hierin afgeweken van de oorspronkelijke methode, bv. bij het homogeniseren : PACKARD gebruikte hiervoor een potterbuis met een Teflon-stamper; werken hiermee

bleek, althans met het door ons gebruikte type, echter onmogelijk. Na uittesten van een aantal andere mogelijkheden bleek de konventionele potterbuis met glazen stamper het beste te voldoen.

Bij het homogeniseren werd eerst het filter stukgemaakt en vervolgens werd de buis een aantal keren op en neer langs de rond-draaiende stamper bewegen. In de geteste range van vier tot zestien keer op en neer traden geen signifikante verschillen in meetre-resultaat op. Uit proeven met een set buizen bleek, dat er geen verschillen in homogenisatieëfficiëntie tussen de individuele buizen voorkwamen.

De variatie in aktiviteit tussen monsters uit hetzelfde zeewater, een maat voor de reproduceerbaarheid der methode, 11.1 $\pm$ 5.2 % van de gemiddelde waarde. Het aandeel hierin, dat na de homogenisatie optreedt, is, uitgedrukt door het verschil tussen de duplo's in procenten van hun gemiddelde waarde, 3.3 $\pm$ 3.0 %. Bij meer dan 15 homogenisaties per buis neemt de variatie en de variantie ervan toe. Boven de 30 keer wordt het homogenaat zo grof, dat verdere verwerking onmogelijk is. Afname van de gemeten aktiviteit t.g.v. deze slijtage kon niet bewezen worden, doordat de daglijks voor de proeven genomen watermonsters onderling niet vergelijkbaar zijn.

Indien één van de duplo's van homogenaten uit versleten potter-buizen 1 minuut ultrasoon getrild werd, bleek de extinktiewaarde ca. 9 % hoger te liggen. De variatie in proefresultaten werd echter niet verkleind. De verhoging is vermoedelijk te danken aan het kapottrillen van (een deel van) de bakteriële fraktie. Dat de variatie niet afnam, werd verklaard door de uitkomst van een chloro-phyllbepaling, waarbij de extraktie resp. door potteren en ultrasoon trillen plaatsvond. In het eerste geval lagen de waarden ca. 16 % hoger. Uit mikroskopisch onderzoek van het homogenaat bleek dat

desondanks nog een aanzienlijk deel van de Scenedesmuspopulatie intakt was. Deze soort overleeft ultrasoon trillen kennelijk nog beter. Homogenisatie van bekende mengpopulaties en kultures leerde, dat in het algemeen zeer kleine cellen (< ca. 5 /u) met een redelijk stevige celwand in een behoorlijk percentage - grof geschat 20 - het potteren kunnen overleven.

Het verdient aanbeveling voor het homogeniseren de zg. glaspareltjesmethode eens uit te testen, om te zien of de bovengenoemde foutenbron, die bovendien een funktie van de planktonsamenstelling is, waardoor de vergelijking tussen verschillende metingen bemoeilijkt wordt, opgeheven kan worden.

De standaardisatie van de INT - oplossing leverde een vrij goed reproduceerbare ijkkurve op. De af en toe wat te ruime spreiding wordt misschien veroorzaakt door een fout in de konstruktie van de anodecel.

Een vergelijkingsproef tussen de Gilson (manometrische) respirometer en de Packardmethode met een gekoncentreerde Chlamydomonaskulture leverde gemiddeld resp. 3.2 en 11.6 /u l O_2 konsumptie/hr per twee ml celsuspensie op. Dat de laatste hoger ligt, is te verwachten, daar hier de potentiële en niet de feitelijke respiratie gemeten wordt. Het verschil is vermoedelijk te klein, omdat ook hier een deel van de cellen niet gehomogeniseerd wordt.

De Packardmethode is door zijn gevoeligheid en reproduceerbaarheid in principe goed bruikbaar, mits de homogenisatieëfficiëntie onafhankelijk van de populatiesamenstelling gemaakt kan worden en een nader onderzoek naar de relatie tussen potentiële en in situ resparatie wordt uitgevoerd.

II. INLEIDING

Het onderzoek naar de energie-flow in zeewater kan men in twee hoofdgroepen opsplitsen, nl. a) de produktiekomponent, het vastleggen van lichtenergie door het fytoplankton en b) de konsumptiekomponent, het verbruik van de in organische verbindingen vastgelegde energie door hetzelfde fytoplankton en de andere, heterotrofe organismen in het water en op de bodem.

Uit produktie- en konsumptieonderzoek bij fytoplankton, kan men de hoeveelheid energie berekenen, die voor de rest van de organismen overblijft. Als men een voldoende gedetailleerd beeld kan krijgen van de verdeling van de konsumptie in diepteprofielen, de benthosrespiratie, het aandeel van de diverse heterotrofe organismekategorieën, waarbij ook de konsumptie per hoeveelheid biomassa belangrijk is, en de invloed van chemische en fysische faktoren, zoals de temperatuur, dan is het in principe mogelijk om uitgaande van zijn eigen biomassa op een bepaald moment, dat van zijn predatoren en zijn voedel, en de heersende biotische faktoren, de ontwikkeling in de "standing-stock" van een organisme te gaan berekenen. Hetzelfde geldt natuurlijk ook voor het fytoplankton, waarbij licht, temperatuur, nutriënten en aan de andere kant "grazers" de aantalsontwikkeling bepalen. Dit soort kennis heeft belangrijke praktische konsekwenties voor de visserij.

Duidelijk is wel, dat het maken van energiemodellen een geweldige hoeveelheid oecologische kennis vereisen. RILEY (1947) deed een stap in deze richting, maar door gebrek van kennis over de grootte van allerlei parameters, konden zijn formules niet meer dan een theoretische aanzet zijn.

Het totnutoe verrichte werk is voor het overgrote deel produktieonderzoek. Vooral sedert de C^{14}-methode van STEEMAN-NIELSEN

(1952) in zwang kwam, is in een groot aantal gebieden de fotosynthetische aktivitiet bepaald. Komplikaties zijn er nog wel; zo is pas vrij kort bekend, dat de geproduceerde organische verbindingen niet alleen in de cel worden opgeslagen (particulate organic matter), maar ook, soms voor een aanzienlijk deel, worden uitgescheiden (dissolved organic matter). Bij de konventionele methode werd de tweede komponent niet bepaald, hetgeen een onderschatting van de produktie opleverde. Door de radio-aktiviteit in het van CO_2 ontdane, gefiltreerde water (residu is particulate organic matter) te meten, kan deze fout hersteld worden (GIESKES, 1972). Zo zijn er nog enkele technische en foutenbronnen (CARLBERG, 1972; GIESKES, 1972), maar in elke geval is er een methode beschikbaar, waarmee bruikbare metingen gedaan kunnen worden.

Van het energieverbruik door plankton is daarentegen vrijwel niets bekend. De meest voor de hand liggende wijze om dit te meten is het bepalen van de O_2-konsumptie (SATOMI & POMEROY, 1965). Nu zijn direkte metingen van het zuurstofgehalte van het water voor dit doel meestal zinloos, omdat door turbulentie- en diffusieprocessen respiratie (en ook fotosynthese) effekten niet meer kwantitatief te bepalen zijn. Enkel onder zeer bepaalde hydrografische omstandigheden is dit mogelijk. Een voorbeeld is de Puget Sound, een fjordachtig gebied in de Amerikaanse staat Washington, waar door zg. drempels diepe bassins gevormd worden, waarin water van een hoge dichtheid soms vrij lang "gevangen" blijft. Uitwisseling met het water boven het drempelnivo treedt door de dichtheidsverschillen vrijwel niet op. Daar de temperatuur vaak lange tijd konstant is en er door de diepte geen fotosynthese meer plaatsvindt, is de in situ respiratiesnelheid eenvoudig uit de verandering van het zuurstofgehalte af te lezen. (BARNES & COLIAS, 1958).

Zuurstofkonsumptiemetingen m.b.v. de WINKLER-methode

Voor het bepalen van de respiratie van plankton in water onder "normale" hydrografische kondities maakte men vroeger en in mindere mate ook nu nog gebruik van zwarte glazen flessen. Deze werden geheel gevuld, afgesloten en vervolgens enige tijd, meestal 6-10 uur (HAGMEIER, 1967; PAMATMAT & BANSE 1969), geïnkubeerd onder in situ of zelf te kiezen temperatuur. Na afloop bepaalt men het O_2-gehalte en vergelijkt deze met de aanvankelijke waarde.

Deze methode heeft echter enkele grote bezwaren, die nauw samenhangen met de techniek van O_2-bepaling, de Winkler-methode, een jodometrische titratie (CARRIT & CARPENTER, 1966). De nauwkeurigheid hiervan is beperkt, 20 - 50 μl O_2 per liter water (CARRIT & CARPENTER, 1966). Daar de planktonrespiratie een kwestie van μl per uur is (HAGMEIER, 1966; POMEROY & JOHANNES, 1968), is zodoende een tamelijk lange inkubatietijd noodzakelijk. Bij een lage planktondichtheid, een situatie die normaal is op de oceaan en 's winters ook in de kustwateren (HAGMEIER, 1966), is het werken met de flessenmethode zelfs helemaal niet meer mogelijk (POMEROY & JOHANNES, 1968). De inkubatietijd kan namelijk niet nog meer opgevoerd worden, omdat na ca. 12 uur een mikrobiële opbloei gaat plaatsvinden, waardoor de meetresultaten sterk beïnvloed worden (POMEROY & JOHANNES, 1968; WILLIAMS & ASKEW, 1968).

Verder is de vraag in hoeverre de gemeten konsumptie een lineaire funktie van de tijd is, m.a.w. in hoeverre de gemeten gemiddelde waarde overeenkomst met de in situ respiratie. Deze kleine organismen staan vrij snel aan verhongering bloot, waardoor hun metabolisme daalt. Anderzijds is het goed mogelijk, dat zoöplanktonorganismen een aanzienlijk deel van het fytoplankton in de inkubatietijd konsumeren (SATOMI & POMEROY, 1965). Deze laatste

faktor is d.m.v. een planktontelling eventueel nog te bepalen; de eerste echter niet. Dit vermindert de waarde van de bepaling aanzienlijk.

Behalve de relatieve ongevoeligheid is er nog een groot nadeel aan de Winkler-methode verbonden. Er bestaan een groot aantal modificaties op deze methode. Gebleken is, dat o.a. door verschillen in de standaardisatieprocedures van het natriumthiosulfaat hun uitkomsten vaak signifikant van elkaar afwijken (CARRIT & CARPENTER, 1966). Deze auteurs konstateerden bij een vergelijkend onderzoek, waaraan een aantal zeer ervaren analisten meewerkten, dat ook met dezelfde methode en identieke monsters de gemiddelde waarde en ook de standaarddeviatie per analist signifikant van die van anderen kon afwijken. Aangezien de verschillen meerdere procenten bedragen en dit bij normale zuurstofgehaltes (4 - 5 ml/l) nog vele tientallen μl O_2 betekent, is de Winklermethode voor het bepalen van plankton-respiratie ongeschikt.

Zuurstofelektrodes

Een tweede manier om respiratie te meten is het werken met een zuurstofelektrode. Voorbeelden hiervan worden beschreven door VON OERTZEN & MOTZFELD (1969); en SCHRAMM (1966). De gevoeligheid van deze elektrodes is aanzienlijk beter dan die van de Winkler-titratie. De eerste auteurs geven bij een reaktievaatje van 80 ml 0.5 μl en bij 300 ml 2 μl op. De nauwkeurigheid bij SCHRAMM ligt in dezelfde orde van grootte bij 307 ml 2.5 μl.

Een groot voordeel is bovendien, dat er een kontinue registratie van het zuurstofgehalte plaatsvindt, zodat het verloop van de konsumptie in de tijd is na te gaan. Weliswaar moet het beginpunt geijkt worden met een Winklertitratie, maar daar het juist om de

veranderingen gaat, is de exaktheid van de absolute waarde wat minder belangrijk.

De gevoeligheid is groot genoeg om kontinu de respiratie te meten van grotere individuele waterorganismen zoals wormen, grote en kleine tweekleppigen en wieren als Fucus vesiculosus (VON OERTZEN & MOTZFELD, 1969; SCHRAMM, 1966), maar ook van makroplanktonsoorten als het kreeftje Euphasia pacifica (GILFILLAN, 1972).

De werkvolumina, waarbij de nauwkeurigheid voldoende groot is (tot 2 à 300 ml), zijn echter te klein om in normaal zeewater binnen redelijke tijd mikro-plankton respiratie te kunnen bepalen. Een oplossing is dan het koncentreren van plankton in enige tientallen liters water d.m.v. een centrifuge met een zg. kontinu-kop, of op een wat rustiger manier met de techniek beschreven door POMEROY & JOHANNES (1968). Met het koncentraat kan men in ca. een uur een goede meting verkrijgen.

De vraag is echter in hoeverre de koncentratie de natuurlijke respiratiesnelheid beïnvloed heeft. Voor het grotere zoöplankton is hier wel enig onderzoek naar verricht. Zo vond ZEISS (1963) bij de zoetwatersoort Daphnia magna een twee keer zo snelle ademhaling, als door kompartimentering van een 60 ml vaatje, waarbij het water in het gehele vaatje nog wel vrij kon uitwisselen, zijn leefruimte tien keer zo klein werd. Bij de mariene copepode Calanus finmarchicus kon in dezelfde proef echter geen effekt gekonstateerd worden. Werd bij deze soort het volume van 10.0 ml/dier tot 2.5 verlaagd, door het aantal individuen in dezelfde ruimte op te voeren, dan daalde de O_2-konsumptie met zo'n 45%. Ook andere litteratuurgegevens laten een daling in respiratieaktiviteit bij toenemende dichtheid zien (PARKER & HELM, 1965). Daarentegen vonden SATOMI & POMEROY (1965) in hun gemengde zoöplanktonpopulatie ($>$ 360 μ) bij een verder

opvoeren van de koncentratie van 18 tot 60 mg drooggewicht/l een toename met een faktor 2 - 3.

Al deze gegevens laten zien, dat er interspecifieke verschillen in reaktie op koncentratie bestaan, die vanuit de oecologie van een soort wel verklaard kunnen worden (ZEISS, 1963), dat de gevoelige soorten op verkleining van hun leefruimte met een verhoging van hun metabolisme reageren, hetgeen een normale reaktie op stress is (GILFILLAN, 1972), maar dat bij te grote koncentratie van organismen en/of te lange proefduur uitgescheiden metabolieten waarschijnlijk de respiratiesnelheid doen afnemen (SATOMI & POMEROY, 1965).

Bovendien is behalve de absolute ook de relatieve koncentratie t.o.v. de natuurlijke situatie erg belangrijk. Zo was het O_2-verbruik van een gekoncentreerd makro planktonmonster ongeveer twee keer zo hoog als dat van een qua samenstelling soortgelijk monster, waarvan de natuurlijke dichtheid echter ca. 7 keer hoger lag dan bij de eerste (SATOMI & POMEROY, 1965). Het voorspellen van het koncentratie-effekt bij makro-plankton wordt door deze komplikatie wel zeer moeilijk.

Voor het zeer kleine plankton ($< 10\,\mu$) zijn alleen gegevens bekend van POMEROY & JOHANNES (1968). Zij maakten van hetzelfde watermonster een aantal koncentratie, waarbij de koncentratiefaktor in de range van 800 - 5000 lag. Hun konklusie uit vier proefseries, met elk 3 - 5 meetpunten, is, dat er een lineair verband bestaat tussen koncentratie en respiratie. Alleen bij zeer hoge waarden zou de ademhaling relatief minder toenemen. Daar de korrelatie-rechtes in de richting van de oorsprong zouden lopen, is de uiteindelijk konklusie, dat koncentratie geen effekt op de respiratie-snelheid heeft.

Het geringe materiaal wettigt het trekken van dergelijk vergaande konclusies niet. In de eerste plaats is door het geringe aantal meetpunten het buigpunt in de koncentratie-respiratiekurve niet precies vast te stellen, zodat het gevaarlijk is om er vanuit te gaan, dat alleen bij "zeer hoge" koncentraties afwijkingen optreden. Daarnaast is het van drie van de vier lijnen aanvechtbaar, dat ze in de richting van de oorsprong lopen. De wijze, waarop de gegevens grafisch verwerkt zijn - het O_2-verbruik tegen het aantal gekoncentrateerde liters zeewater - geeft bovendien een vertekening. In de range van 10 - 70 liter is de koncentratiefaktor slechts 6; maar van het werkvolume tot 10 1 bedraagt deze ca. 800.

Een gedetailleerd onderzoek naar het koncentratie-effekt blijft daarom noodzakelijk, wil men zuurstofelektrodes voor plankton-respiratiemetingen gaan gebruiken.

Manometrische methodes

Hetzelfde bezwaar geldt ook voor het werken met manometrische respirometers (zie het overzicht in MONTGOMERY, 1967). De meest gebruikte zijn de Warburg en Gilson apparaten (zie p.38). De nauwkeurigheid, 0.1 µl (med. G. v.d. Hoek), en de reproduceerbaarheid van de laatste is groter (MONTGOMERY, 1967). Aangezien het werkvolume van de reaktievaatjes meestal niet meer dan 2 ml bedraagt, is ook hier voor het werken met mikroplankton koncentratie noodzakelijk.

Indirekte methoden ter bepaling van de respiratiegrootte

a) Fosfaatexcretie

SATOMI & POMEROY (1965) vonden a zekere mate van lineair verband tussen de fosfaatexcretie en de respiratie bij het grotere zoöplankton (>360 µl). De spreiding is echter tamelijk groot. Er zijn echter

aanwijzingen dat de helling van de regressielijn per soort of per groep van soorten kan verschillen, afhankelijk bv. van het gebruikte voedsel en verschillen in het metabolisch systeem. Op grond hiervan kan verwacht worden, dat de korrelatie beter is in rijke gebieden met een stabiele populatie met betrekkelijk weinig soorten, dan in nutriëntenarm oceaanwater, waar de aantallen klein zijn, de organismen vaak vlekvormig verspreid en taxonomisch verschillend. De gegevens uit voorbeelden van beide type gebieden bevestigen dit : korrelatiekoëfficiënten resp. 0.94 en 0.43.

Het feit dat LE BORGNE (1973) een zeer nauwe korrelatie tussen fosfaatexcretie en respiratie vond voor zoöplankton $> 200\,\mu$, waardoor volgens hem bij het bekend zijn van de ene waarde de andere zondermeer berekend zou kunnen worden, zou hiermee in overeenstemming kunnen zijn, daar het werk in een rijk opwellingsgebied verricht werd.

Bepaling van de fosfaatexcretie voor de berekening van de O_2-konsumptie kan in bepaalde situaties voor groter zoöplankton waardevol zijn, maar is als uniforme methode zelfs voor deze kategorie niet bruikbaar. Voor het kleinere zoöplankton is de methode ongeschikt, daar de uitgescheiden fosfaathoeveelheden zo gering zijn, dat nauwkeurige meting niet mogelijk is (WILLIAMS & ASKEW, 1968).

b) Substraatopnamekinetiek

Dit type onderzoek geeft evenmin gegevens over de respiratie van alle planktonvormen, maar is in principe wel belangrijk om de mineralisatieaktiviteit van een speciale fraktie, de mikrobiologische populatie, te bepalen (VACCARO & JANNASCH, 1966).

De opnamesnelheid van een bepaald substraat door een bepaald mikro-organisme wordt beschreven door een Michaëlis-Mentenvergelijking (LEHNINGER, 1970). Het probleem is, dat de natuurlijke koncentratie

van organische substraten in zeewater zeer laag is en niet normaal gemeten kan worden. Door in gefiltreerd zeewater een bio-assay te gebruiken met een bekende Michaëliskonstante K_t (de substraatkoncentratie, waarbij de opnamesnelheid de helft van de maximale snelheid is) en bovendien radio-aktief gemerkt - VACCARO & JANNASCH werkten met glukose - toe te voegen, zodat de opnamesnelheid bepaald kon worden, is het mogelijk de natuurlijke glukosekoncentratie S_n te bepelen.

Voegt men nu aan ongefiltreerd zeewater een hoeveelheid radioaktief glukose toe en bepaald men de opname hiervan door de cellen, dan kan de K_t in het water berekend worden en daardoor ook de transporttijd, de tijd die nodig is om het natuurlijk substraat in zijn geheel op te nemen. De in situ substraatassimilatiesnelheid wordt dan berekend uit het quotiënt van S_n en de transporttijd.

De vraag is echter of de K_t van een reinkultuur door het overbrengen in een ander milieu niet in grootte verandert (VACCARO & JANNASCH, 1966). Een fout in deze aanpak is bovendien, dat geen rekening wordt gehouden met respiratie van opgenomen C^{14}- glukose; dit kan bij een drie uur inkubatie tot enkele tientallen procenten van het totale geïnkorporeerde substraat oplopen (HOBBIE & CRAWFORD, 1969).

Voor een kinetische analyse is wel een verzadigingskurve (Michaëlis-Mentenkurve) nodig; gebleken is dat in oligotrofe mariene wateren de substraatopname bij toenemende koncentratie niet aan zo'n kurve voldeed. Dit veranderde als er een 24 uur inkubatie met kleine hoeveelhaden ongelabeld substraat aan de proef voorafging; kennelijk was er toen een dominante populatie van een soort gevormd. Elke referentie tot de natuurlijke situatie is dan wel verdwenen. Zo'n populatieopbouw bestaat er van nature vaak wel in nutriëntrijke en

vervuilde wateren, zodat hier minder problemen te verwachten zijn (JANNASCH, 1971).

Deze is dus niet bruikbaar voor normaal zeewater. Door het gebrek aan kennis van de relatie tussen substraatassimilatie en respiratie in de kinetische analyse ook verder niet bruikbaar voor het meten van mikrobiologische respiratie (WILLIAMS & ASKEW, 1968).

c) Substraatrespiratiemetingen

WILLIAMS & ASKEW (1968 bepaalden direkt de respiratie van gelabeld substraat, door de $^{14}CO_2$ produktie te meten. Hierbij moet voorkomen worden, dat door substraattorvoeging een snelle mikrobiële groei ontstaat of dat er enzyminduktie optreedt, daar anders de metingen geen enkele relatie meer tot de natuurlijke substraatrespiratie hebben. Dit kan voorkomen worden, door het substraatnivo zo laag en de inkubatietijd zo kort mogelijk te houden; de benedengrens wordt bepaald door de gevoeligheid van de methode.

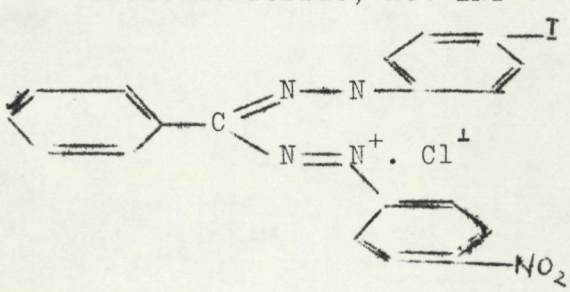
WILLIAMS & ASKEW konden op deze manier goede metingen verkrijgen van de mineralisatiesnelheid van glukose door planktonische mikro-organismen (hoewel vrij veel algesoorten ook glukose kunnen opnemen, zijn de koncentraties hiervoor vermoedelijk te laag). De waarden vormen gezien het grotere aantal substraten een minimum voor hun gehele heterotrofe aktiviteit. In principe zou men een radioaktieve koktail van alle natuurlijk aanwezige substraten kunnen aanbieden, maar dit is voorlopig nog niet mogelijk. Een stap in deze richting is reeds gedaan door BANOUB & WILLIAMS (1972), die naast glukose ook een aminozuurmengsel als substraat gebruikten.

d) Enzymaktiviteitsmetingen

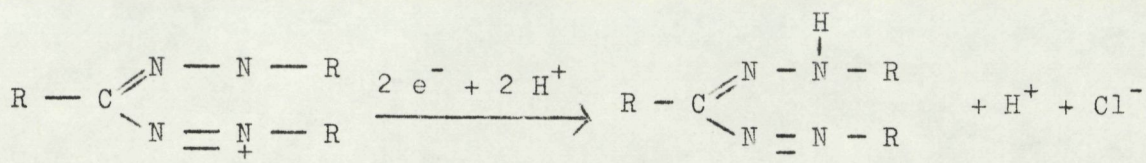
Voor de mikrobiologische fraktie van het plankton biedt de methode

van WILLIAMS & ASKEW goede perspektieven. De besproken technieken boden echter nog geen bevredigende oplossing voor een direkte of indirekte bepaling van de O_2-konsumptie van het gehele plankton. De O_2-opname is echter een funktie van een reeks van enzymatische reakties, die tussen de substraatoxydatie en de O_2-assimilatie geschakeld zijn. Meting van de aktiviteit van een van de enzymsystemen zou een even goede maat voor de respiratie zijn, als het O_2-gebruik zelf (CURL & SANDBERG, 1961). Het eenvoudigst is, dat de betrokken enzyreaktie snelheidsbeperkend is voor het gehele systeem (PACKARD et al. 1971).

Rond 1950 kreeg men belangstelling voor een groep stoffen, die voor de kwantitatieve cytochemie van groot belang zou worden. Het betreft hier de zg. tetrazoliumzouten, die gekenmerkt worden door een heterocyclische ringstruktuur met één koolstof- en vier stikstofatomen, waarvan één quartenair. Verder zijn er in de meeste gevallen drie fenylgroepen aan deze ring verbonden. Er zijn twee typen, de mono- en ditetrazoliumzouten. Hiervan zijn zeer veel synthesevormen mogelijk door variatie in de aan de fenylgroepen te adderen molekulen (ALTMAN, 1972). Zo is de struktuurformule van het monotetrazoliumzout 2(-p-iodophenyl)- 3(p-nitrophenyl) - 5 phenyl - tetrazoliumchloride, het INT :



In geoxydeerde vorm zijn het allemaal witte of bleekgele, wateroplosbare stoffen. Bij milde reduktie gaan ze echter over in een rood gekleurde, wateronoplosbare verbinding, het zg. formazan (ALTMAN, 1972):



Het formazan lost wel op in organische oplosmiddelen en leent zich daarom goed voor extraktie en kwantitatieve bepaling m.b.v. een spektrofotometer.

De redoxpotentiaal van tetrazoliumzouten blijkt nu zodanig te zijn, dat ze met komponenten van het mitochondriale elektronen-transportsysteem, het E.T.S. (zie Fig. 1) kunnen reageren, waarbij ze elektronen, die normaal via het E.T.S. aan O_2 gekoppeld zouden worden, opnemen.

ALEEM (1955) was een der eersten, die een tetrazoliumzout voor planktononderzoek gebruikte. De formazanproduktie werd hierbij als maat voor de totale planktonpopulatiedichtheid genomen. Echter, hoewel hij voor een aantal monsters uit hetzelfde gebied en van dezelfde datum een redelijk lineair verband tussen hoeveelheid formazan en de de celdichtheid vond, is het te verwachten dat de regressie van de korrelatielijn geen konstante is, maar afhangt van de populatiesamenstelling (bij kleine organismen is de relatieve respiratiesnelheid groter); m.a.w. de formazanvorming is geen konstante maat voor de populatiedichtheid en daarom in deze zin niet bruikbaar.

CURL & SANDBERG (1961) gingen de mogelijkheid na om via de formazanextinktie de aktiviteit van dehydrogenaseënzymen te bepalen. Als testorganisme gebruikten zij hiervoor, zowel intakt

als gehomogeniseerd, een voorntje, Menidia menidia.

Bij homogenaten is extra substraat nodig, daar anders de gemeten aktiviteit zeer gering is; bij intakte dieren is de afhankelijkheid hiervan minder, hoewel toevoeging nog altijd 10% aktiviteitsverhoging geeft. Een zestal substraten werd uitgetest; hiervan bleek alleen succinaat effekt te sorteren. De verklaring hiervoor is, dat alleen succinaat in vitro situaties zonder toevoeging van bepaalde co-faktoren verademd kan worden. Deze methode geeft dus een aktiviteitsbepaling van het enzym succinaatdehydrogenase SDH (op de verdere biochemische achtergrond wordt nog teruggekomen).

CURL & SANDBERG hebben een aantal tetrazoliumzouten uitgetest : INT bleek het snelste te reageren en het meest gevoelig te zijn. De redoxpotentiaal van INT/formazan ligt veel lager dan van $\frac{1}{2}$ O_2/H_2O ; zuurstof zal daarom niet als storende faktor (konkurrentie om de elektronen) bij de INT-reduktie optreden (ALTMAN, 1972).

Het is noodzakelijk, dat men bij dit soort bepalingen een zodanige substraatkoncentratie kiest, dat de enzymaktiviteit hier onafhankelijk van is (Michaëlis-Mentenkurve), daar anders de resultaten niet te interpreteren. Men krijgt dus geen meting van de in situ, maar van de potentiële aktiviteit : van de maximale snelheid van succinaatoxydatie onder de enzymkonstellatie van een organisme op een bepaald moment. De inkubatietijd moet dan wel zo gekozen zijn, dat binnen deze periode de aktiviteit (bepaald d.m.v. de formazanextinktie) en de tijd een lineair verband vertonen.

Behalve bepaling van de geschikte succinaatkoncentratie deden CURL & SANBERG nog een aantal andere essentiele methodische proeven, zoals bepaling van de optimale pH, chemicaliënkoncentraties etc.

Bij het betrokken visje bleek er een lineair verband tussen O_2-konsumptie en formazanextinktie te bestaan, zodat metingen van

de SDH-aktiviteit als substituut voor de bepaling van de O_2-opname gebruikt kunnen worden. PACKARD & TAYLOR (1968) zetten een vervolgstap in de richting van het planktononderzoek; zij vonden bij het garnaaltje Artemia salina een zeer nauwe lineaire korrelatie tussen SDH-aktiviteit en de respiratie, gemeten met een zuurstofelektrode.

Gebleken is echter, dat SDH wel geschikt is voor indirekte respiratiemetingen bij de zoölogische fraktie van het plankton, maar niet voor het fytoplankton (PACKARD, 1971). Deze auteur stelt dat metingen aan het ETS een betere maat voor de potentiële planktonrespiratie is, omdat het maximum van dit systeem de uiteindelijke limiet voor de O_2-konsumptie betekent. Het grote voordeel van het ETS is, dat het vrijwel universeel is (ALTMAN, 1972; PACKARD et al. 1971).

Uit Fig. 1 blijkt dat er twee elektronenbronnen zijn voor het ETS. Ten eerste het gereduceerde co-enzym nicotinamide adenine dinucleotida, NADH; de geoxydeerde vorm kan op verschillende plaatsen in de glycolyse, de citroenzuurcyclus en bij de afbraak van vetzuren en eiwitten gereduceerd worden. Ten tweede het enzym succinaatdehydrogenase; deze bezit nl. een prosthetische groep, het flavine adenine dinucleotide FAD, dat bij de oxydatie van succinaat tot $FADH_2$ gereduceerd wordt.

$FADH_2$ en NADH dragen aanvankelijk hun elektronen over op twee aparte flavoproteinesystemen. Via het co-enzym Q (ubiquinon) komen elektronen van beide systemen terecht in het cytochroom-b, waarna het verdere verloop langs de cytochroomketen tot en met de koppeling aan zuurstof identiek is (GREEN, 1964; LEHNINGER, 1970). Gebleken is dat de opnamesnelheid van cytochroom-b beperkend is voor het gehele systeem; juist op deze plaats grijpen een aantal tetrazoliumzouten,

w.o. INT, aan (ALTMAN, 1972). Door nu overmaat NADH en succinaat te geven, is het mogelijk de maximale ETS-aktiviteit te bepalen.

PACKARD (1971) voegt aan zijn inkubatiemedium echter in gereduceerde vorm ook het tweede belangrijke co-enzym, nicotinamide adenine dinucleotidefosfaat (NADPH) toe; dit omdat NADPH de elektronendonor van het microsomale ETS zou zijn. Uit alles blijkt dat PACKARD er vanuit gaat, dat er maar één soort ETS bestaat, dat zowel in mitochondrieën als in microsomen voorkomt.

In de laatste zijn echter meerdere soorten elektronentransportsystemen aanwezig, waarvan de struktuur vaak nog slecht bekend is. Het meeste weet men nog van het cytochroom P_{450} systeem ; deze bestaat vermoedelijk uit twee ketens, waarbij in de ene onder opname van O_2 en oxydatie van NADH vetzuren gedesatureerd worden en in de tweede bij O_2-opname en NADPH oxydatie stereïden gehydroxyleerd worden. Andere cytochroomketens dienen weer, met NADPH-oxydatie en O_2-opname, voor het openbreken van aromatische ringen. Generatie van ATP vindt in al deze systemen echter nooit plaats. Ze komen eveneens in vrijwel alle organismen, zowel eu- als prokaryoot, voor, al kan de plaats van lokalisatie wel eens verschillen (ALTMAN, 1972; LEHNINGER, 1970).

De tetrazoliumzouten reageren ook met deze elektronentransportsystemen, al is de precieze aangrijpingsplaats nog niet bekend. PACKARD (1971) schrijft de totale formazanproduktie dus ten onrechte uitsluitend toe aan het systeem, waar de ATP generatie plaatsvindt, maar praktische konsekwenties heeft dit niet : door de korrekte samenstelling van het inkubatiemedium geeft de geproduceerde formazanhoeveelheid inderdaad de maximale O_2-konsumptie weer, waartoe de organimen in staat zijn.

De omrekeningsfaktor tussen beide grootheden wordt bepaald

door de INT-oplossing elektro-chemisch te reduceren, zodat de relatie tussen het aantal opgenomen millicoulombs en de formazan-extinktie vastgesteld kan worden. Via het eletrochemisch ekwivalent van 1 µl 1 O_2, 17.2 mC, kan dan tenslotte de zuurstofkonsumptie berekend worden (PACKARD & HEALY, 1968).

De eerste metingen, die aan marien plankton zijn verricht, lijken bruikbare resultaten op te leveren. Opvallend is de grote gevoeligheid : zelfs in watermonsters van 5000 m diep werd aktiviteit gemeten (PACKARD et al. 1971). Dit terwijl PAMATMAT & BANSE (1969) op een diepte van 180 m met de donkere flesmethode (Winkler-titratie) niets konden meten. Deze gevoeligheid is belangrijk omdat, ondanks de geringe heterotrofe aktiviteit per liter, de totale aktiviteit door de grote diepte van sommige zeeën toch wel belangrijk kan gaan worden.

III. DOEL VAN HET ONDERZOEK

Doel was allereerst de door PACKARD (1971) beschreven methode te konkretiseren in een gestandaardiseerde proefuitvoering. De volgende fase is dan het uittesten van een bepaald aspekt van de methode, nl. de homogenisatie. PACKARD vermeldt niets over de effektiviteit van zijn wijze van homogeniseren. In de inleiding is reeds uiteengezet dat homogenisatie essentieel is voor het kunnen meten van aktiviteit. Indien bepaalde soorten nu niet of slechts ten dele stuk gaan, dan worden metingen aan monsters met een verschillende populatiesamen-stelling minder goed vergelijkbaar, hetgeen de bruikbaarheid van de methode aantast.

Verder moet ook de wijze, waarop de homogenisatie uitgevoerd wordt, nader getest worden; de vraag hierbij is, welke manier het beste resultaat geeft en in welke mate standaardisatie vereist is.

Tenslotte moet voor een beoordeling van de verkregen resultaten de Packardmethode eens vergeleken worden met een konventionele methode om respiratie te meten.

IV. MATERIAAL EN METHODE

A. Chemicaiën

Wat betreft de chemische aspekten, hierbij is zondermeer de "receptuur" van PACKARD (1971) gevolgd. In een reeks van proeven testte hij verschillend samengestelde homogenisatiebuffers en bepaalde hij de koncentraties van de diverse komponenten hierin en in de substraatoplossing. Optimaal is dan die koncentratie waarbij een maximale aktiviteit gemeten wordt. PACKARD maakte tevens gebruik van testresultaten van CURL & SANDBERG (1961).

De benodigde oplossingen zijn :

1) a. 0.1 M KH_2PO_4 : 13.6 g KH_2PO_4 per liter

   b. 0.1 M Na_2HPO_4 : 14.2 g Na_2HPO_4 = 35.8 g $Na_2HPO_4.12\ H_2O$

   c. Eén liter 0.1 M fosfaatbuffer met pH 7.7 wordt verkregen door 106 ml a bij 894 ml b te voegen.

2) De zg. stock homogenisatiebuffer SHB wordt verkregen door aan 1 liter 0.1 M fosfaatbuffer 9 mg $MgSO_4$ (= 18.4 mg $MgSO_4.\ 9\ H_2O$) en 1.5 g polyvinylpyrrolidon (PVP) (mol. gew. 25.000) toe te voegen.

3) Stock substraatoplossing SSO : per 100 ml fosfaatbuffer wordt 3.6 g natriumsuccinaat opgelost.

4) Een 0.2 % INT-oplossing : 100 mg INT per 50 ml aqua bidest. Door een pH-elektrode in de oplossing te houden en vervolgens kleine hoeveelheden - 0.05 tot 0.1 ml per keer - 1 N Na_2CO_3 toe te voegen, kan de pH op 7.5 gebracht worden. Eventuele overschrijdingen kunnen op dezelfde wijze met 1 N HCl gekorrigeerd worden.

Op deze wijze wordt het totale volume slechts weinig beïnvloed. INT lost vrij moeilijk op. De snelste manier is het licht opwarmen (tot 40°C) van de oplossing, terwijl deze door een magnetische roerder kontinu in beweging wordt gehouden. Na een uur is het grootste gedeelte wel opgelost; door het opvoeren van de pH tot 7.5 wordt bovendien de oplossing van de resterende deeltjes versneld. Een heldere vloeistof wordt tenslotte verkregen door deze m.b.v. een papierfilter te filtreren.

5) Een 0.15 M $FeCl_3$ oplossing, verkregen door 12.0 g (= 20.3 g $FeCl_3 . 6 H_2O$) in 500 ml water op te lossen.
6) Het solutiemiddel voor formazan bestond uit een 1 : 1.5 mengsel van tetrachloorethyleen en aceton.
7) Een 40 % formalineoplossing.

Alle oplossingen moeten worden aangemaakt met aqua bidest.; dit om de kans op verontreinigingen, die remmend kunnen werken op het reaktieverloop, zo klein mogelijk te houden.

Daar PVP en natriumsuccinaat vrij snel door bakteriën worden afgebroken, moeten de SHB en de SSO in bevroren toestand bewaard worden. Hetzelfde geldt voor de INT oplossing; in dit geval om bakteriële reduktie tegen te gaan (PACKARD, 1971).

De eigenlijke homogenisatiebuffer en de substraatoplossing maakt men elke dag opnieuw. Daartoe worden eerst de bekerglazen met voorraadoplossingen ontdooid. Voor de eerste voegt men per 100 ml SHB 15 mg glutathion (gereduceerd) toe, en voor de tweede per 100 ml SSO 63.2 mg NADH en 20 mg NADPH. Beide oplossingen worden in de koelkast bij ca. 5°C bewaard bewaren dan 1 dag geeft volgens PACKARD verlies aan aktiviteit en daardoor een minder goede vergelijkbaarheid der resultaten. Door de snelle inkorporatie door bakteriën van de drie genoemde stoffen bij wat hogere temperaturen, is het niet

raadzaam deze mee in te vriezen met de voorraadoplossingen. Daar bij de geforceerde ontdooiingen de temperatuur, zij het kort, wel eens tot 20° C kan oplopen, kan men na een aantal dagen reeds vermindering van aktiviteit verwachten.

Daar de gebruikte chemicaliën, speciaal NADPH, kostbaar zijn, is het gewenst per dag niet meer aan te maken dan per sé noodzakelijk is. Voor twee proefseries, d.w.z. 8 bepalingen in duplo, kan met 50 ml substraatoplossing en 27 ml buffer volstaan worden. Van beide vloeistoffen zijn dan resp. 2 en 3 ml beschikbaar om de pipetten voor te spoelen.

$MgSO_4$ wordt aan de bufferoplossing toegevoegd, omdat Mg^{2+}ionen voor veel respiratie-enzymen noodzakelijk zijn voor aktiviteit (GREEN, 1965). De aktiviteit van een aantal enzymen is bovendien afhankelijk van de aanwezigheid van een gereduceerde zwavelverbinding; vandaar dat gereduceerd glutathion in de buffer opgenomen wordt (EPPLEY et. al. 1969). Polyvinylpyrrolidon is een colloid-stabilisator, die althans tijdelijk de desintegratie van enzymsystemen tegengaat (ALTMAN, 1972). Bovendien inaktiveert het bij de homogenisatie vrijkomende fenolen, die enzymen kunnen vergiftigen (EPPLEY et. al. 1969). Een fosfaatbuffer met alle drie bovengenoemde stoffen geeft een veel hogere formazanvorming naderhand, dan bij een buffer, waarin één of meer van deze stoffen ontbreken (PACKARD,1971).

Uitvoering van een bepaling

Monsterpunt

Vanaf de kop van de vlonder in de NIOZ-haven werden in 5 1 jerrycans de zeewatermonsters genomen. Het betrof hier altijd water uit de bovenste 5 cm. Er werd zorg voor gedragen dat eventueel aanwezige oliesporen niet in het monster kwamen. De mogelijkheid kan nl. niet

uitgesloten worden, dat olie invloed op de meetresultaten heeft.

B. HET FILTRATIEPROCES

a) Filters

In principe zijn er drie soorten beschikbaar, nl. papier-, membraan- (bestaande uit cellulose-esters) en glasvezelfilters. De eerste is door zijn grotere poriën, minimaal 1.5 µ tegen 0.4 - 0.8 bij de andere twee, minder effektief, terwijl de filtratietijd erg lang is (LENZ, 1971). Beide andere typen verschillen niet in filtratie-effektiviteit, maar de tijd nodig voor filtratie van een zelfde volume water is bij een membraanfilter ca. tien keer zo lang als bij een glasvezelfilter (LENZ, 1971; LONG &COOKE, 1972).

LONG & COOKE (1972) vonden nog een belangrijk punt in het nadeel van membraanfilters, dat ook voor dit onderzoek erg belangrijk is. Als na filtratie van identieke watermonsters over beide type filters en na homogenisatie van filter + filtraat in potterbuizen met glazen stamper (zie p.27). het chlorophyllgehalte bepaald werd, dan lag deze bij membraanfilters signifikant lager. De taxonomische afkomst van de dominante soort(en) in een monster bleek deze verschillen niet te beïnvloeden. Kennelijk gaan de algecellen beter stuk, als er tegelijk een glasvezelfilter gehomogeniseerd wordt, hetgeen aan de snijdende werking van de glasvezels toegeschreven kan worden.

Uit eigen proeven bleek bovendien dat, indien het water door opwerveling van bodemdeeltjes wat troebel geworden was (bij harde wind), membraanfilters onmiddellijk "dichtsloegen", zodat verder filtratie onmogelijk werd.

In dit onderzoek zijn daarom uitsluitend glasvezelfilters gebruikt (type Whatman GF/C met Ø 5.5 cm).

b) Filtratieopstelling

Voor het filtreren kon gebruikt gemaakt worden van het filtratiebord van R. MANUELS. Hierop is plaats voor drie 2 l afzuigkolven, waarop de tweedelige glazen filtretiekoppen bevestigd worden. Het oppervlak van het onderstuk hiervan wordt gevormd door een gesinterd glasplaatje, waarop het filter komt te liggen. Het bovenstuk, een aan twee zijden open voorraadcylindertje, wordt hierop gezet, waarna beide helften m.b.v. een metal beugel lekvrij tegen elkaar geklemd worden.

D.M.V. een slangensysteem zijn de drie kolven verbonden met een vakuümpomp. Indien voor de laatste een waterstraalpomp gebruikt wordt, is het noodzakelijk een terugslagkolf in het systeem op te nemen. De aangelegde onderdruk bedroeg 0.3 - 0.15 atmosfeer.

Daar de filtratie vooral in het begin zeer snel gaat, is het niet mogelijk om door bijvullen het volume (0.3 l) in de drie voorraadcylinders op peil te houden. Daarom werd er op het filtratiebord een konstruktie gebouw, waardoor boven elke filtratiekop een 1.5 l chromatografiekolom kon worden gehangen. De uitloopsnelheid kon m.b.v. een krantje geregeld worden.

c) Het filtreervolume

Getracht werd in hooguit een half uur filtreren zoveel mogelijk biologisch materiaal te verzamelen. De faktor, die het uiteindelijke volume beperkt, is dan de troebelheid van het water; de range in dit onderzoek bedroeg 1 - 3.5 l.

De hoeveelheden werden afgepast in een 1 L maatcylinder. De meetfout hierbij is hooguit 0.5 %.

d) De filtreerprocedure

Daar de wat zwaardere deeltjes en organismen vrij snel uitzakken, werd voor het afmeten de jerrycan steeds geschud. Na het vullen van kolom en cylindertje werd de vakuümpomp gestart; tijdens het filtreren werd het volume in het voorraadcylindertje steeds op peil gehouden. Als beide leeggestroomd waren, werden ze met gefiltreerd zeewater goed nagespoeld. Na het opheffen van de onderdruk werd de beugel om de filterkop losgemaakt en het filter voorzichtig verwijderd. Met het dichtgevouwen filter werd de onderrand van het voorraadcylindertje afgeveegd, waarna het in de potterbuis met bufferoplossing werd gestopt (zie onder).

C. HOMOGENISATIEMETHODIEK

PACKARD (1971) gebruikte een Teflon-glas homogenisator, bestaande uit een glazen buis met teflonstamper; dit is een modificatie van de klassieke potterbuisset, welke een glazen stamper bezit. De stamper kan vrij in de buis bewegen, maar de totale speling is zeer klein, ca. 120 μ . De stamper wordt bevestigd aan een motortje en in de buis wordt het te homogeniseren materiaal met wat vloeistof, meestal een buffer, gebracht. Door de erop ronddraaiende stamper wordt de oppervlaktelaag steeds in stukjes gescheurd. Deze zakt daardoor iets, en de stukjes worden dan tussen de wanden van buis en stamper omhooggeperst. Dit proces gaat door, totdat de stamper de bodem van de buis bereikt. De homogenisatie wordt dan voltooid door de buis een aantal keren op en neer te bewegen, zodat de vloeistaf herhaalde malen tussen de buiswand en de snel ronddraaiende stamper geperst wordt.

Indien de laatste precies in het midden van de buis zou bewegen, dan zou de vrije ruimte zo'n 60 μ zijn. In de praktijk zal

dit tussen 0 en 120 varieren.

Een deel van de planktonorganismen zal deze ruimte zondermeer al niet kunnen passeren, zonder kapotgescheurd te worden. Gezien de grote krachten die op de vloeistof uitgeoefend worden, zullen ook de celwanden van kleinere organismen veelal uit elkaar geslagen worden. De aanwezigheid van scherpe glasvezels bevordert dit proces bovendien (LONG & COOKE, 1972).

Aanvankelijk werd getracht ook met een Teflon-glas homogenisator to gaan werken. Ondanks uitvoerige pogingen bleek het onmogelijk om het filter stuk te krijgen. De verklaring hiervoor ligt in de gladde kop van de stamper, die geen houvast op het filtermateriaal kon krijgen. In principe zou het mogelijk zijn, in ribbels in de kop uit te snijden, maar door de zachtheid van het teflon zouden deze ogenblikkelijk weer wegslijten (med. A. Vaars).

Kennelijk werkte Packard met een geschikter type dan deze (merk Tri-R), maar hij geeft geen verdere details. Het werk met teflonstampers werd daarom gestaakt.

Dit leidde tot het uitproberen van enkele andere beschikbare technieken.

a) Ultrasone trilling

De trilstaaf werd hierbij in een buis met buffer en filter gebracht. Om de temperatuur niet te hoog te laten worden, hing de buis in een bekerglas met water en ijsblokjes. Het filter bleek door absorptie de trillingsenergie dusdanig af te dempen, dat zelfs na 10 minuten trillen er slechts een dikke brei ontstaan was, waarmee onmogelijk verder gewerkt kon worden (pipetteren). Ultrasoon homogeniseren is kennelijk alleen mogelijk bij cel-suspensies. In principe kunnen deze gemaakt worden, door i.p.v. filtreren het zeewater te centrifugeren. Gezien de lage

hoeveelheid biomassa per liter, althans in de onderzoeksperiode, was het niet zinvol dit met konventionele centrifuges te proberen: de grootste buizen op dit lab zijn slechts 0.2 L . Gebruik van een centrifuge met een kontinu-kop is een veel te tijdrovende procedure.

b) Mechanische weefselhomogenisatoren

Getest werden de "Virtis-23 Macro Homogenizer" en de "Polytron PT 10" (met dank aan dr. W. de Ligny, RIVO - IJmuiden). Beide zijn gebaseerd op het principe van snel ronddraaiende mesjes (maxima resp. 23.000 en 16.000 rpm). Het materiaal wordt op deze wijze tot "vloeistof versneden". Het homogeniseren van het filter leverde ook hier onoverkomelijke problemen op, daar stukjes filter op de mesjes blijven zitten. De Polytron gaf nog het beste resultaat, maar kwantitatief werken is toch niet mogelijk. Bovendien produceerde dit apparaat zoveel warmte, dat de koeling problemen opleverde.

Uiteindelijk werden de proeven voortgezet met de klassieke potterbuisset (Braun, type Potter S, 5 ml) : zowel buis als stamper van borosilikaatglas. De voordelen van een glazen t.o.v. een teflonstamper zijn 1) de veel grotere hardheid, waardoor ze voor taaier materiaal geschikter zijn. Zelfs al wordt de teflonstamper met 25 % glas versterkt, dan nog is de hardheid inferieur aan die van een glazen stamper. En 2) de aanwezigheid van ribbels op de kop van de stamper.

Nadelen zijn 1) de veel grotere kans op breken, hetgeen gezien de hoge draaisnelheid niet zonder gevaar is, en 2) de veel grotere slijtage.

Met het oog op nadeel 1 werd bij het homogeniseren steeds met een veiligheidsbril gewerkt. Voor de aandrijving van de stamper werd

een Braun elektromotor (max. onbelast toerental 19.000 rpm) gebruikt. De snelheid was regelbaar m.b.v. een transformator (0 - 260 V). Bovendien was in de schakeling nog een regelbare weerstand met voetbediening opgenomen, waarmee de motor aan het draaien gebracht kon worden tot de door het transformatorvoltage bepaalde maximale snelheid. Hierdoor had men de handen vrij voor het vasthouden van de potterbuis.

Aanvankelijk werd als verbindingsstukje tussen de stamper en de as van de motor een stukje rubberslang gebruikt; dit om de steel van de stamper wat flexibeler te maken, zodat de kans op "wrikken", waardoor het glas kan knappen, kleiner werd. Omdat het rubber echter nooit helemaal loodrecht stond, geringen er op de stamper ook zijdelingse krachten werken, ten gevolge waarvan deze regelmatig vastliep en de nodige vertraging ontstond.

Daarom werd overgeschakeld op een 4.4 cm lang perspex tussenstuk, waarbinnen een open "buis" liep. Deze werd aan de ene kant op de as gedrukt en in de andere opening werd de stampersteel gedraaid, welke m.b.v. twee inbusschroefjes vastgezet werd.

De draaisnelheid moet niet te hoog zijn, daar dit zeer snelle slijtage zou veroorzaken en bovendien de kans op ongelukken vergroten, maar tocht voldoende kracht kunnen leveren om de weerstand van het filter te breken. Het optimale voltage bleek 120 te zijn, hetgeen bij een onbelast ronddraaien neerkomt op ca. 8800 rpm.

Om de temperatuur zo min mogelijk te laden oplopen, werden de potterbuizen steeds in een bekerglas met ijswater gehouden.

Per homogenisatie werd 3 ml buffer gebruikt: hierin zit dan 75 μ M $MgSO_4$, 0.5 mM glutathion en 4.5 mg polyvinylpyrrolidon.

D. DE INT REDUKTIE

Het homogenaat in de potterbuis werd m.b.v. een schudapparaat nog eens goed gemengd, waarna er, in duplo, 1 ml in een centrifugebuis gepipetteerd werd. Vervolgens werd aan elke buis 3 ml van de substraatoplossing toegevoed en tenslotte 1 ml INT oplossing. Op het moment van INT toevoeging werd de stopwatch ingedrukt. Per centrifugebuis is dan 5 ml vloeistof aanwezig en hierin zit naast het homogenaatmateriaal 0.15 nM NADPM, 80 mM natriumsuccinaat, 0.5 mM NADH en 0.04% INT.

De buizen staan in een rekje in een waterbad. Daar geen exemplaar met temperatuurregulatie voorradig was, werd als watertemperatuur 20°C genomen, ongeveer gelijk aan die van de lucht, zodat tijdens de proef de watertemperatuur nauwelijks veranderde (max. 0.3°C).

Voor de blanko-bepaling (referentie voor de fotometrische bepaling) gebruikte Packard aanvankelijk 1 c.c. gekookt homegenaat (PACKARD et al. 1971), later gewoon homogenaat, maar i.p.v. 3 c.c. SO werd 3 c.c. buffer toegevoegd (PACKARD, 1971). Deze verandering wordt niet gemotiveerd.

Deze wijze van bepaling is niet overgenomen. Voor het verkrijgen van een blanko werd door een filter wat gefiltreerd zeewater afgezogen, waarna het op de eerder beschreven wijze gehomogeniseerd werd; 1 c.c. hiervan, wederom in duplo, werd verder op de normale manier geïnkubeerd (zie ook p.).

Een proefserie bestond uit drie gelijktijdige filtraties plus een blanko, hetgeen door de duplo's dus 8 bepalingen betekende.

De centrifugebuizen werden eerst allemaal met de verschillende homogenaten gevuld; nadat de eerste reaktie gestart was, werd 3 c.c. SO in de volgande gepipetteerd en precies 60 sekonden na de

eerste werd nr. 2 gestart door er INT aan toe te voegen, etc.

Op deze wijze kon bovendien een schudschema aangehouden worden, waarin de inhoud van elke buis om de 4 min. opgewerveld werd. De 1-minuutintervallen waren bovendien noodzakelijk i.v.m. het relatief tijdrovende stoppen van de reaktie. Na 20 min. werd er nl. 1 c.c. 40 % formaline toegevoegd en 1 c.c. $FeCl_3$, waarna de inhoud van de buis goed gemengd werd. Tenslotte werd deze in een ijsbad gezet; door deze handelingen is alle enzymaktiviteit vernietigd (PACKARD, 1971).

Alle inkubatiemengsels ondergaan op deze wijze een identieke behandeling. In principe zouden de 8 buizen snel achter elkaar gestart kunnen worden, maar doordat alle "stophandelingen" zo'n 25 sec. in beslag nemen, betekent dit dat de looptijd van de diverse reakties ongelijk wordt, hetgeen een op zich weer tijd kostende administratie tijdens de proef en rekenwerk achteraf vereist.

E. BEPALING FORMAZANEXTINKTIE

Een 1 : 1.5 mengsel van tetrachloorethyleen en aceton voldoet aan de eisen, die aan een geschikt oplosmiddel gesteld moeten worden : 1) onoplosbaar in water, 2) vormt geen onverbreekbare of sterke emulsies met water, en 3) heeft een redelijk lage dampspanning (niet te vluchtig (CURL & SANDBERG, 1961). Door de polaire eigenschappen van aceton lost een deel op in het water en kan daarom makkelijk kontakt maken met de daarin aanwezige formazanpartikels. Deze worden gebonden aan het a-polaire deel van het aceton en vervolgens doorgegeven aan het in water volledig onoplosbare tetrachloorethyleen.

In elke buis wordt nu 4 c.c. van het solutiemiddel gepipetteerd (m.b.v. een rubberballon i.v.m. de grote giftigheid van beide

komponenten) en daarna met een rubberstop afgesloten. Hierna werd het formazan geëxtrageerd door de buizen in twee series van vier met de hand te schudden volgens het schema $1\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{2}$ - 1 minuut.

Vervolgens werden ze via 5400 g 3 - 4 min. bij 6500 g gecentrifugeerd. In de buis worden dan drie lagen gevormd : op de bodem tetrachloorethyleen met het rode formazan; daarop een koek van filter- en slib/organisch materiaal en daarboven tenslotte een heldere waterige vloeistof. M.b.v. een 2 ml injektiespuit werd de rode vloeistof zo goed mogelijk opgezogen en vervolgens in een reageerbuis gespoten. Met dezelfde spuit werd in totaal nog eens ca. 4.5 ml van het solutiemiddel (tevens schoonmaken spuit) hieraan toegevoegd, zodat het totale volume van de formazanoplossing 6.0 ml bedroeg. PACKARD (1971) vulde aan tot 8.0 ml, maar gezien de lage extinktiewaarden in dit winterhalfjaar was verdunning tot 6.0 ml ruim voldoende. Deze verschillen vormen verder geen probleem, omdat de waarden door het rechtevenredige verband tussen log extinktie (=fotometerbepaling) en de koncentratie (wet van LAMBERT-BEER) eenvoudig vergelijkbaar te maken zijn. De buizen werden onmiddelijk na het vullen afgesloten.

Tenslotte werden de glaskuvetten, na voorspoelen, met de diverse oplossingen gevuld en in een Zeiss-spektrofotometer bij λ = 490 mμ (CURL & SANDBERG, 1961) de extinkties t.o.v. de blanko

Formazan en licht

Formazan is lichtgevoelig; de kleur verandert hierbij van rood in lichtgeel. In direkt zonlicht binnen een minuut, in fel licht zonder zon in ca. een kwartier en in zwak licht na enkele dagen. De extinktie loopt hierbij terug.

Een steekproef, waarin een drietal buizen 42 uur (w.o. twee nachten) in zwak licht (raam op het noorden, belastore onlaag)

bleven staan, leverde een extinktieverlies van 12.3 ± 3.5 % op. Bij vier buizen, die eveneens afgesloten 9 dagen in het donker stonden, bedroeg dit 0.6 ± 1.2 %.

PACKARD verzuimt in zijn publikaties hiervoor te waarschuwen; dit verschijnsel werd proefondervindelijk gekonstateerd, toen bij een wijziging in de proefuitvoering de formazanverwerking bij het raam ging plaatsvinden. Naar later bleek, memoreren CURL & SANDBERG, (1961) en ALTWOOD (1972) het lichteffekt wel.

De resultaten voor de ontdekking zijn hoogstwaarschijnlijk niet beïnvloed, door kleurveranderingen nooit waargenomen werden en in een aantal gevallen, waarin de extinktie na een half uur opnieuw bepaald werd, was geen wijziging opgetreden. Gezien het vrij zwakke licht is bij de korte expositietijd ook nog geen effekt te verwachten.

Na onderkenning van het lichteffekt werden alle proeven verder bij gedeeltelijke verduistering uitgevoerd, terwijl de reageerbuizen zoveel mogelijk in een donkere ruimte gehouden werden.

De totale duur van een proefserie bedroeg ca. 4½ uur. Tevens kost het aanmaken van de verse substraat- en bufferoplossingen, en af en toe ook van nieuw INT en SSO, gemiddeld een half uur per dag. Uit efficiëntieoverwegeningen werd het schoonmaken van glaswerk in eigen hand gehouden, daar de laatste fase hier van met aqua bidest. dient te geschieden (PACKARD et. al. 1971). Getracht werd zoveel mogelijk twee series per day te doen; hetgeen een weekproduktie betekende van 8 à 9.

F. IJKING INT-OPLOSSING

Inleiding en materiaalbeschrijving

Voor het berekenen van de uiteindelijke O_2-konsumptie is het nodig de gemeten extinktie om te kunnen rekenen in een hoeveelheid

elektrische lading. CURL & SANBERG (1961) deden dit door het INT met bekende koncentraties askorbinesuur te reduceren; de laatste vormde dan weer een maat voor een bepaalde hoeveelheid millicoulombs. Beide auteurs vonden een lineair verband tussen de formazanextinktie en de askorbinezuurkoncentratie. PACKARD & HEALY (1968) verkregen daarentegen een min of meer holle kurve. Dit laatste zou nog geen ernstigbezwaar zijn, maar de reproduceerbaarheid zou gering zijn door het optreden van auto-oxydatie bij het askorbinezuur.

Een mogelijk substituut is cysteïne, maar het bezwaar hiervan is de lange standaardisatietijd (8 hr.). PACKARD & HEALY probeerden het daarom met een elektrode. Uit een polarogram van een INT-oplossing bleek, dat, naast de op grond van de chemische struktuur te verwachten opname van twee elektronen, bij hogere voltages nog meer elektronen werden, hetgeen toegeschreven wordt aan additie op de stikstofplaatsen van de tetrazoliumring. Dit betekent dat bij reduktie d.m.v. een elektrode het potentiaalverschill tussen kathode en INT-oplossing tussen de 0.60 en 0.75 V moet liggen; in deze range heeft het INT twee elektronen opgenomen, maar is er van sekundaire additie nog geen sprake.

Tevens moet, wil men zonder problemen de doorgevoerde lading kunnen berekenen, de stroomsterkte zeer konstant zijn, hetgeen kereikt kan worden door een grote weerstand in het circuit op te nemen. D.M.V. de in Fig. 2 afgebeelde schakeling wordt aan beide eisen voldaan (PACKARD & HEALY, 1968). Voor de stroommeting werd een Philips gelijkspannings(buis)voltmeter GM 6020 gebruikt.

Door beide auteurs wordt ook de te gebruiken elekrolysecel beschreven en afgebeeld. Bij vergelijking van tekening en beschrijving bleek echter, dat uitgaande van de laatste, de afgebeelde cel technisch onmogelijk was.

Na gezamelijk overleg over de alternatieven heeft G. v.d. Hoek tenslotte het in Fig. 3 afgebeelde ontwerp getekend, waarna de cel door een glasblazer gemaakt kon worden. De kathode bestaat uit een laag kwik op de bodem. Door het glas steekt een platinadraad, die kontakt maakt met het kwik, en die via een draad aansluit op de rest van het circuit. Aanvankelijk werkten PACKARD & HEALY met een platinaplaatje als kathode, maar deze bleek minder geschikt te zijn, omdat zich hieraan H_2 ontwikkelde, hetgeen tot storingen in de stroomsterkte leidde. Bovendien had het gevormde formazan de neiging het platina te coaten, waardoor de INT reduktie belemmerd werd. De hogere waterstofoverspanning van kwik verhindert H_2 ontwikkeling. Door een smal glazen buisje, aan het uiteinde afgesloten door gesinterd glas, in het kwikoppervlak te steken en hierdoor N_2 te blazen, wordt het kwik opgewerveld, zodat het reduktieoppervlak steeds vernieuwd wordt. Omdat in de oplossing aanwezige zuurstof gemakkelijk aan de kwikkathode kan worden gereduceerd, hetgeen een storend effekt geeft, kan men voor het opwervelen beter N_2 gebruiken dan lucht (VERBRUGH, 1966).

De anode bestaat uit een 2.4 cm^2 platinaplaatje, dat in een afzonderlijk vaatje gevuld met 0.1 M KH_2PO_4 steekt. Het vaatje is van onderen afgesloten met gefrit glas; dit garandeert wel elektrische kontinuiteit tussen de elektroden, maar vertraagt de diffusie van elektrolyseprodukten zeer sterk. In onze cel funktioneerde deze konstruktie echter nog niet goed, waardoor de anodevloeistof er binnen tien minuten uit kon druppelen. Door een klein rubberstopje in het vulgaatje te stoppen, hield de lekkage t.g.v. toenemende onderdruk snel op

De anode en de in- en uitvoerbuisjes voor het stikstof zijn bevestigd in een P.V.C. stop, waarin een rubberringetje ligt,

waardoor de glazen cel luchtdicht afgesloten kan worden. De cel zit in een aan een standaard bevestigde klem. Het geheel staat in een bak, waardoor eventueel wegspringende, zeer giftige kwikdruppels opgevangen kunnen worden.

IJkprocedure

Het anodevaatje wordt gevuld met 0.1 M KH_2PO_4. Vervolgens wordt op de bodem van de cel schoon kwik gebracht, totodat het nivo even boven de platinadraad staat. Hierop wordt het reaktiemengsel gepipetteerd : 2 x 1 c.c. aqua bidest., 1 c.c. stocksubstraatoplossing (succinaat in fosfaatbuffer), 1 c.c. fosfaatbuffer en 1 c.c. 0.2 % INT oplossing. Het succinaat is in het systeem de elektronendonor (PACKARD & HEALY, 1968). Hierna wordt de stop op de elektrolysecel geplaatst en m.b.v. een rubberslangetje het invoerbuisje aangesloten op een stikstofcylinder met drukregelaar. De druk wordt zodanig ingesteld, dat het kwikoppervlak voldoende in beweging is, zonder dat de inhoud van de cel te wild opgewerveld wordt.

Om de meeste lucht uit de oplossing te verdrijven wordt eerst twee minuten N_2 doorgeblazen. Daarna werd tegelijk met een stopwatch de circuitschakelaar aangezet. Na de gewenste tijd wordt de elektrolyse gestopt. De stop wordt hierna losgemaakt en m.b.v. een een 2 ml injektiespuit, gevuld met solutiemiddel, worden de onderdelen ervan boven de cel schoongespoten; hetzelfde gebeurde met de bovenrand van het glas. Met een pasteurpipet wordt het kwik even geroerd, zodat ook eventueel ingesloten formazan wordt opgenomen. Vervolgens wordt het kwik afgetapt, waarna de formazanoplossing, de waterige laag en wat kwiksporen in een 30 c.c. centrifugebuis opgevangen worden. Met ca. 2c.c. wordt de cel zorgvuldig nagespoten. Met aqua dest. en daarna aqua bidest. wordt de cel gereinigd en vervolgens met filtreerpapier gedroogd, zodat het weer voor de

volgende bepaling gereed is.

Het werk wordt bij gedeeltelijke verduistering uitgevoerd, en de centrifugebuizen worden, afgesloten met een rubberstop, in het donker bewaard.

De na een ijkserie verkregen reeks buizen wordt in de centrifuge geplaatst en ca. 3 min. aan 6500 g blootgesteld. Door de oppervlaktespanning van het water blijven nl. kleine hoeveelheden tetrachloorethyleen met formazan drijven, die in de centrifuge wel naar beneden geslagen worden. Met de injektiespuit wordt de roodgekleurde vloeistof op de bodem opgezogen en aangevuld tot 6.0 ml, waarna, de extinktie bepaald werd. Daar de waarden boven de 0.5 minder nauwkeurig worden, bevelen PACKARD & HEALY aan in die gevallen te gaan verdunnen. De dan gevonden extinkties zijn op eenvoudige wijze (zie p.33) tot die bij 6.0 ml te herleiden ("normaliseren"). Als blanko fungeert steeds het solutiemiddel.

G. GILSON RESPIROMETER

Inleiding

De Gilson differentiële respirometer is verwant aan het klassieke Warburgapparaat, met dien verstande dat het er bij de laatste om gaat het volume in de vaatjes konstant te houden en bij de Gilson de druk. De reaktievaatjes staan bij de Gilson elk in verbinding met een been van een U-vormige buis, waarin zich met soedanrood gekleurde gezuiverde petroleum bevindt. Bij gaskonsumptie of produktie loopt de vloeistof resp. op of wordt beneden gedrukt. Door het volume m.b.v. een gekalibreerde stelschroef zodanig te veranderen, dat de meniscus van de vloeistof in beide benen weer even hoog staat (op de buis is een ijkstreepje aanwezig), wordt de spanning in het vaatje weer gelijk aan dat van de buitenlucht gemaakt.

De verandering in volume is op de stelschroef rechtstreeks op 0.2 μ l nauwkeurig af te lezen.

Dit systeem werkt veel eenvoudiger dan een Warburg en is bovendien nauwkeuriger (MONTGOMERY, 1967). Op andere technische bijzonderheden en de wijze van gebruik zal hier niet verder worden ingegaan.

Proefuitvoering

De bij de proef gebruikte mariene eencellige alg Chlamydomonas sp. werd gekweekt op het volgende voedingsmedium :

per liter 30 g zeezout
50 mg Na_2EDTA
20 mg K_2HPO_4
100 mg $NaNO_3$
200 mg $NaHCO_3$
10 mg gistextrakt
ca. 5 ml grondextrakt

De pH moet met natriumbicarbonaat op 8.0 gebracht worden (gegevens drs. J.H. Vosjan).

Eén liter hiervan werd verdeeld over acht 300 ml erlemeyers, welke vervolgens met een watteprop afgesloten en gesteriliseerd werden. In een kast een steriele luchtstroom (Munktel Sterile Bench) werden de voedingsmedia geënt met Clamydomonas, waarna ze in de schudplaat van een psycrotherme inkubator geplaatst werden. Onder kontinue belichting werden de erlemeyers gedurende een kleine twee weken bij 20°C geschud. Toen waren de kultures voldoende gegroeid om gebruikt te worden.

M.b.v. een centrifuge werd het totale volume teruggebracht tot ca. 1/5. Na door schudden de kulture zo goed mogelijk homogeen gemaakt te hebben werd 2 ml in het eerste vaatje gepipetteerd; na wederom goed schudden 2 ml in de volgende, etc.

Om storing door fotosynthetische O_2-produktie tegen te gaan,

werden de konsumptievaatjes ingepakt in aluminiumfolie. Voor het binden van de gevormde CO_2 werd in de binnenste ring van het vaatje een met 1 N KOH bevochtigd filtreerpapiertje aangebracht. In de twee produktievaatjes werden beide handelingen achterwege gelaten.

Nadat de vaatjes waren aangesloten, werden ze in het waterbad - temperatuur 20°C - van de Gilson geplaatst, waarin ze kontinu geschud werden. Om het gehele systeem aan deze situatie te laten adapteren, werd 30 min. gewacht, voor de eigenlijke proef gestart werd. Het beëindigen gebeurt door het kontakt met de buitenlucht te herstellen.

V. RESULTATEN

A. Homogenisatieproeven

Proef I : De invloed van de homogenisatiewijze op de meetresultaten en een vergelijking van de homogenisatie-efficiëntie der individuele potterbuizen.

Proefopzet.

Het homogeniseren moet in elk geval bestaan uit het kapotmaken van het gehele filter. Deze handeling wordt op een min of meer konstante wijze uitgevoerd, zij het dat de benodigde tijd (gemiddeld 1¼ minuut) wel wat kan varieren. Nagegaan werd in welke mate het aantal keren op en neer bewegen van de buis langs de stamper van invloed is op de uiteindelijke resultaten. Dit werd getest in twee reeksen resp. van negen en tien proefseries, waarin in de eerste per serie één buis 4 x, een tweede 6x en de derde 8x op en neer bewogen werd. In de andere reeks was dit 8, 12 en 16x.

Elke potterbuis heeft een eigen, ingeslepen stamper. Getest werd of het gebruik van een bepaalde buis de metingen beïnvloedde, m.a.w. hoe gestandaardiseerd is de inslijpprocedure bij de fabriek.

Om de buizen vergelijkbaar te houden, moet de slijtagesnelheid per buis ook zo min mogelijk verschillen. Een zodanig proefschema werd opgesteld, dat alle drie buizen gemiddeld ongeveer even vaak op en neer bewogen werden. Voor de blanko's werd steeds dezelfde potter-buisset gebruikte, terwijl de behandeling altijd identiek was, nl. 8x op en neer.

Verwerking der gegevens en uitkomsten

Om de invloed van zowel de buis als de homogenisatie-wijze op de enzymaktiviteitsmetingen te onderzoeken, moet een variantieanalyse uitgevoerd worden. In Tabel I. staan de gemiddelde extinkties van de beide duplo's t.o.v. het gemiddelde van de twee blanko's, opgesplitst naar buis en behandeling. M.b.v. de vermelde sub-totalen ($\sum i$, $\sum j$, $\sum ij$) kan men de deelvarianties berekenen van de vier komponenten behandeling, buis, interaktie buis x behandeling en de restpost het toeval (SOKAL & ROHLF, 1969).

Om te beoordelen of één of meer van de eerste drie komponenten en signifikante invloed op de resultaten hebben, werd de F-toets gebruikt. De F-parameter wordt berekend door de deelvariantie van één van deze drie te delen door die van het toeval. De waarden in beide reeksen zijn :

4 - 6 - 8x		8 - 12 - 16x	
$F_{behand.}$	= 0.104 (3.55)	$F_{behand.}$	= 1.17 (3.46)
F_{buis}	= 0.030 (3.55)	F_{buis}	= 0.62 (3.46)
$F_{inter.}$	= 0.149 (2.93)	$F_{inter.}$	= 0.15 (2.85)

De tussen haakjes geplaatste getallen geven de F-waarden bij een eenzijdige overschrijdingskans van 5 % (signifikantiegrens) aan. In beide reeksen is er van enig signifikant effekt geen sprake.

M.b.v. het in deze proef verkregen cijfermateriaal kunnen ook berekeningen gemaakt worden over de reproduceerbaarheid van de

gegevens, een maat voor de betrouwbaarheid van de methode.

A) Een maat voor de reproduceerbaarheid van dat deel van de methode, dat op de homogenisatie volgt, is de grootte van het verschil tussen de duplobepalingen, uitgedrukt in procenten van hun gemiddelde waarde. In de A-reeks (4 - 6 - 8x) bedroeg deze waarde 3.3 $\pm$ 3.0 % (n = 30; daar de buizen kennelijk identiek zijn, zijn de gegevens van een proefserie, waarbij de buisnummers nog niet genoteerd waren, in de berekening opgemomen). In de B-reeks (8 - 12 - 16x) was dit 5.5 $\pm$ 6.3 % (n = 28; in twee gevallen waren geen duplo's beschikbaar).

Toetst men de verschillen in variantie m.b.v. de F-toets ($F = s.d._B^2/s.d._A^2$), dan krijgt men F = 4.55 bij 27 en 29 vrijheidsgraden. Dit betekent dat de variantie in de B-reeks signifikant ($p < 0.005$) groter is dan die in de A-reeks. Het verschil van 2.2 % tussen de gemiddelde waardes, getest met de toets van WILCOXON, is niet signifikant (parameter u = 0.86).

Nu zitten er in de B-reeks een drietal duploverschillen, die aanzienlijk groter zijn dan de rest. Laat men deze "uitbijters" bij de berekening weg, dan bedraagt het gemiddelde duploverschil 3.6 $\pm$ 3.1 %. Van signifikante verschillen met de eerste reeks is nu geen sprake meer.

B) Daar de buis en de behandelingswijze kennelijk niet van invloed zijn op de resultaten, mogen de drie waarden per proefserie onderling vergeleken worden. Een maat voor de reproduceerbaarheid van de gehele methode ligt in de verschillen tussen deze drie extinktiewaarden, die alle drie als steekproeven uit dezelfde watermassa beschouwd kunnen worden. De variatieparameter is dan het grootste verschil tussen deze waarden (elk het gemiddelde van twee duplo's), uitgedrukt in procenten van hun gemiddelde.

In de A-reeks bedraagt deze parameter gemiddeld 11.1 $\pm$ 5.2 % (n = 10); voor de B-reeks 18.5 $\pm$ 10.5 % (n = 10). De varianties verschillen signifikant van elkaar (F = 4.04, $0.01 < p < 0.025$), evenals de gemiddelden, getoetst m.b.v. WILCOXON (u = 1.66, p = 0.048).

In de tweede reeks komen echter twee extreme waardes voor, resp. van 29.8 en 42.9 %, terwijl de rest tussen de 6.1 en 19.7 % ligt. Laat men deze uitbijters weg, dan wordt het gemiddelde 14.1 $\pm$ 4.1 % (n = 8). De varianties verschillen nu niet signifikant meer (F = 1.66, evenals het verschil tussen de gemiddelden van 3.0 %, dat met STUDENT's t-toets getest werd (t = 1.20).

Proef II : Het effekt van ultrasoon trillen van de homogenaat-vloeistof op de gemeten aktiviteit.

Proefopzet.

Zoals reeds op pg. 28 beschreven is, bleek het niet mogelijk het filter m.b.v. een ultrasone trilstaaf te homogeniseren. Deze apparatuur wordt echter veelvuldig gebruikt voor het desintegreren van mikro-organismen, zij het dat de effektiviteit bij een aantal soorten bakteriën gering is, hetgeen schijnt samen te hangen met hun speciale celwandstruktuur (med. J.H. Vosjan). De mogelijkheid zou dus kunnen bestaan, dat een ultrasone behandeling volgend op een gewone homogenisatie m.b.v. de potterbuis de extinktiewaarden verhoogt.

Van een homogenaat werd 1 c.c. op de gewone wijze (1) behandeld en 1 c.c. werd bovendien 1 min. ultrasoon getrild (2). Per proef-serie werden weer drie watermonsters gebruikt; er werden 8 series uitgevoerd, zodat het aantal paren gegevens 24 bedroeg.

Verwerking der gegevens en uitkomsten

De op 1 L zeewater omgerekende extinktiewaarden voor beide behandeling staan in Tabel I. Indien men voor de onderlinge vergelijking de extinktie van de "normale" behandeling steeds op 1.000 stelt, dan bedraagt het gemiddelde voor methode (2) 1.091 $\pm$ 0.087. Uitgaande van gelijke varianties voor (1) en (2) is het verschil van 0.091, getoetst met de variant van de t-toets voor gepaarde uitkomsten, hoogst signifikant ($t = 4.95$). Ook als men er vanuit gaat dat de varianties niet gelijk zijn en toetst met de verdelingsvrije Teken-toets, verkrijgt men het zelfde resultaat ($T = 20$, $p < 0.005$).

Tevens kan men de invloed van ultrasoon trillen op de variatie in de aktiviteitsmetingen bepalen. Als parameter wordt wederom het maximale verschil tussen de drie waarden per serie in procenten van gemiddelde waarde gebruikt. Bij de metingen volgens methode (1) bedroeg deze 25.7 $\pm$ 20.9 ($n = 8$), en volgens methode (2) 25.6 $\pm$ 21.3 %. Ultrasone desintegratie heeft dus op de variatie geen enkele invloed. Ook als men uit beide reeksen één zeer extreme waarde schrapt, behoeft deze konklusie niet gewijzigd te worden. De gemiddelden worden dan resp. 18.8 $\pm$ 10.7 % en 18.1 $\pm$ 8.2 % ($n = 7$ in beide gevallen).

Proef III : Idem als proef II, maar nu met nieuwe potterbuizen

In proef II waren dezelfde potterbuizen gebruikt als in proef I. Dit was gedaan met het oog op een eventuele invloed van de ultrasone behandeling op de variatie in de metingen. Bij wijze van steekproef is proef II nog eens herhaald in een proefserie met zes filtraties, waarbij nieuwe potterbuizen gebruikt werden voor de homogenisatie.

De op 1 L zeewater genormaliseerde extinkties staan in Tabel II. Stelt men wederom de waarden volgens de normale behandeling

op 1.000, dan bedraagt het gemiddelde voor methode (2) 1.077 ± 0.076. Noch de variantie (F = 1.32), noch de gemiddelde waarde zelf (t = 0.34) wijken signifikant af van de resultaten met de oude potterbuizen.

Daar de zes monsters allemaal uit dezelfde watermassa komen, zijn ze dus onderling vergelijkbaar. Het gemiddelde van de metingen volgens methode-(1) bedraagt dan per liter water 0.091 ± 0.007 en dat van methode-(2) 0.098 ± 0.005. De varianties verschillen niet signifikant van elkaar (F = 2.0); het verschil van 0.007 tussen de gemiddelden is net niet signifikant (t = 1.73). Gebruikt men echter de Teken-toets voor de verschillen tussen de paren, dan liggen de meetwaarden volgens methode-(2) signifikant hoger dan die volgens methode-(1) (T = 6, p = 0.025).

Ook nu blijkt ultrasone desintegratie de extinktiewaarden dus signifikant te vergroten.

Proef IV : Een vergelijking van de homogenisatie-efficiëntie van veelvuldig gebruikte (oude) met die van nieuwe potterbuizen.

Ook hier bleef het bij een steekproef. Zes monsters van 1.5 L werden drie van de filters werden met oude potterbuizen gehomogeniseerd en drie met nieuwe. De verdere bepalingen werden in duplo uitgevoerd.

De gemiddelde extinktie voor de met oude buizen gehomogeniseerde watermonsters bedroeg 0.339 ± 0.035; bij de nieuwe buizen was dit 0.338 ± 0.017.

Met dit geringe materiaal is het trekken van konklusies niet mogelijk. Een voortzetting van deze proef was onmogelijk, daar de homogenaten van de oude buizen een dergelijke dikke brei vormden, dat het pipetteren zelfs met glaspipetten niet meer uitvoerbaar was.

EFFEKTIVITEIT VAN DE HOMOGENISATIE

Naast de proeven die tot doel hadden de faktoren in het homogenisatie-proces op te sporen, die de uiteindelijke extinktiewaarden beïnvloeden, is ook nagegaan in welke mate de in het seston aanwezige organismen kapotgemaakt zijn.

Hiertoe werd 10 c.c. van een zeewatermonster in een bezinkvaatje gebracht. De aanwezige cellen kunnen gekonserveerd worden door een druppel kaliumjodide toe te voegen; als men na zo'n twee uur reeds gaat kijken, kan het ook zonder KJ. Het met een glasplaatje afgedekte vaatje werd in een omkeermikroskoop geplaatst, zodat de bezonken cellen konden worden bekeken. Daar aktief bewegende organismen (zoöplankton) in zo'n steekproef meestal niet voorkomen, werd ook nog een liter door een 70 µ planktonnet gespoeld. Monsters van het residu werden bij een kleine vergroting onder een normale mikroskoop bekeken.

De eerste waarnemingsserie (9 maart) werd verricht met zeer troebel havenwater; t.g.v. stormachtig weer was kennelijk veel bodemmateriaal opgewerveld. Dit kwam tot uiting in de aanwezigheid in twee onderzochte bezinkvaatjes van typische bodemdiatomeeën als Gyrosigma fasciola, Navicula sp., Amphora sp. en Achnantes sp..

Verder werden aangetroffen de planktondiatomeeën Coscinodiscus sp., Rhaphoneis amphiceros, Cyclotella sp. (evt. Melosira sp.), Asterionella kariana, Biddulphia aurita en Melosira sulcata; de laatste wordt tot de zoetwatersoorten gerekend. Daarnaast nog de Chlorophyceae Scenedesmus quadricauda (zeer veel) en de zoetwater-soort Pediastrum sp.

In de homogenaten van deze monsters werd één soort frekwent intakt aangetroffen, Scenedesmus. Van de andere was geen spoor meer te bekennen. Het glasvezelfilter was in de vrijwel nieuwe potterbuizen

zeer goed stukgemaakt; in het homogenaat waren bijna alleen nog maar enkelvoudige vezels aanwezig.

Op 13 maart was het havenwater zeer helder. In het residu van het 70/u planktonnet zaten veel planktondiatomeeën, vooral Coscinodiscus concinnus en C. excentricus. Verder Actinoptichus undulatus, Skeletonema sp., Asterionella sp., Chaetoceros sp., Biddulphia regia en B. sinensis, Ditylium brightwelli, Podosira stelliger, Rhizosolenia sp. en Thallasionema sp. Bovendien de groenalg Pediastrum, de dinoflagellaat Noctiluca (1 ex.) en aan zoöplankton een Naupliuslarve en Tintinnidiae.

In twee bezinkvaatjes zaten weer zeer veel Scenedesmuscellen, en daarnaast ook vrij frekwent de "groene" zoetwatersoort Coelastrum microporum. Verder de diatomeeën Skeletonema, Ditylium brightwelli (1x), Asterionella, Thallasionema, Cyclotella sp.; aan zoöplankton een aantal Tintinnidiae.

Van de 3 c.c. homogenaat werd 30/u L in een bezinkvaatje gebracht met 10 c.c.gefiltreerd zeewater. In de bezinklaag werden wederom frekwent Scenedesmuscellen aangetroffen en een drietal exemplaren van Coelastrum. Alle andere organismen konden niet teruggevonden worden.

Nagelaten is om kwantitatief te bepalen hoeveel Scenedesmus er in 1 L zeewater zit en hoeveel hiervan nog over is in het homogenaat. Dit had gekund door bv. 1 cm^2 van het bezinkvaatje in de omkeermikroskoop te tellen als er 10 ml zeewater in zit en als er 30/u L homogenaat in gesuspendeerd is. Afgaande op de groffe indruk van de frekwentie in beide gevallen zou men echter toch een idee kunnen krijgen van het deel, dat de homogenisatie overleefd heeft. Als alle cellen de behandeling doorstaan zouden hebben, dan moet er in de bezinklaag van 30/u L homogenaat, waarin bij een

randomverdeling het 10^{-2} deel van het seston van 3 L zeewater zit, ruim drie keer zoveel Scenedesmus moeten zitten als in de bezinklaag van 10 c.c. water. De frekwentie is echter kleiner, grofweg de helft. Dit zou dan betekenen dat zo'n 80 % gehomogeniseerd is.

Bij wijze van proef werden ca. 100 c.c. van kultures van de eencellige groenalg Chlamydomonas, de bruinalg Isochrysis en de diatomee Skeletonema gehomogeniseerd. De laatste was in tegenstelling tot de natuurlijke situatie als losse cellen in de kulture aanwezig, en dus niet tot veel grotere verbanden gegroepeerd. Alle drie soorten zijn zo'n 4 - 5 µ lang.

Ook hier bleken nog veel cellen de behandeling overleefd te hebben. In de bezinklaag van 50 µ homogenaat in 10 c.c. gefiltreerd zeewater kwamen ze alle drie nog frekwent voor.

B. IJKING INT

Van twee 0.2 % INT-oplossingen werden elk twee ijkkurves gemaakt. Voor oplossing A staan beide series in Tabel III^{A} en de gegevens zijn uitgezet in Fig. 4. De extinktiewaardes van beide series voldoen resp. aan de regressielijnen $y = 0.0184\ x - 0.054$ en $y = 0.0170\ x - 0.019$. De verschillen zijn in het onderzochte ladingstrajekt echter klein en niet systematisch : de ene keer ligt het meetpunt van serie I hoger dan die van II, de andere keer is het andersom. De gegevens kunnen m.i. daarom samengevoegd worden, hetgeen de regressielijn $y = 0.0177\ x - 0.038$ oplevert; de lineaire korrelatiekoëfficient is zeer hoog, nl. 0.992.

Bij oplossing B (Tabel III^{B} en Fig. 5) geeft serie I nog min of meer een regelmatig verloop, waarvoor de bekende regressielijn $y = 0.184\ x + 0.076$ bedraagt. Serie II geeft tot 50 mC zeer hoge en zeer onregelmatige waardes; pas boven de 50 mC wordt het verloop

regelmatig en komt het overeen met dat van serie I. Voor alle meetpunten van de tweede serie werd de regressielijn y = 0.0156 x + 0.510 berekend. Deze is gezien de b-waarde van 0.510 weinig realistisch. Daarom werd voor de berekeningen in de "Gilson-proef", waarbij deze INT-oplossing gebruikt werd, de regressielijn y = 0.0192 x + 0.077 aangehouden, welke gebaseerd is op de waarden van serie I en de laatste vier van serie II.

C. VERGELIJKING METHODE PACKARD EN GILSON RESPIROMETER

Een vergelijking tussen de resultaten van een manometrische respiratiemeting (Gilson) en die volgens de methode van Packard.

Proefopzet

In de Gilson werd in vijfvoud de respiratie van 2 ml van een gekoncentreerde Chlamydomonassuspensie gemeten. Twee vaatjes werden niet verduisterd met aluminiumfolie en hierin werd de netto O_2-produktie bepaald. Dit neven-proefje werd verricht om een beeld te krijgen van de verhouding tussen O_2-produktie en konsumptie bij deze algen. Tevens kan het een indruk geven van de fysiologische toestand waarin de gesuspendeerde cellen zich bevinden. Zouden deze weinig of geen O_2 produceren of nauwelijks op een sterke lichttoename reageren, dan zou dit een indikatie zijn, dat de organismen door een of andere oorzaak inaktief geworden waren; hetgeen voor de interpretatie van de respiratiegegevens belangrijk is.

Met het opvoeren van de lichtintensiteit kon tevens gekontroleerd worden of de verduistering van de respiratievaatjes wel afdoende was. Aanvankelijk werd in zwak licht gewerkt, na twee uur werd de fotosystheseverlichting van de Gilson, 14 lampen van 60 W, ingeschakeld.

Van dezelfde algenkulture werd in drievoud 20 ml over een

glasvezelfilter gefiltreerd, waarna de aktiviteit op de drie filters, in duplo, bepaald werd volgens de eerder beschreven methode van Packard.

De inkubatie bij beide methodes werd verricht bij 20°C.

Verwerking gegevens en uitkomsten

De zuurstofkonsumptie bij 20°C, gemeten in de Gilson, in vier vaatjes is in Fig. 6 uitgezet tegen de tijd. De gegevens van het vijfde vaatje zijn niet verder verwerkt, omdat deze niet lichtdicht bleek te zijn, zodat in het eerste deel van de proef zelfs een geringe produktie optrad. De andere vier vertoonden geen "lichteffekten".

De metingen duiden op een min of meer regelmatige konsumptie. Opvallend is dat de onregelmatigheden in het verloop bij alle vier vaatjes syschroon verlopen. De lineaire korrelatiekoëfficient is desondanks hoog, 0.96. De berekende regressielijn is $y = 0.054\ x + 0.81$. Hierin is y de O_2-konsumptie in /u L en x de tijd in minuten. Dit betekent, dat het gemiddelde zuurstofverbruik van 2 ml ingedikte kulture 3.2 /u L per uur bedraagt.

De formazanextinkties in de Packard-methode bedroegen bij een inkubatietijd van tien minuten, genormaliseerd op 6.0 ml, 2.539, 2.097, en 1.710. Het zuurstofverbruik in /uL/hr/L wordt berekend met de formule :

$$A = \frac{q\ H\ s}{17.2\ V} \times \text{de gekorrigeerde absorptie}$$

(d.w.z. genormaliseerd op hetzelfde volume als waarbij de ijkserie gemaakt is)

De faktor q herleidt de gemeten respiratie tot het verbruik per uur; bij een normale inkubatietijd van 20 min. is q = 3, in dit geval dus 6.

H is het totale homogenaatvolume/inkubatievolume, = 3.

s is de helling van de ijkkurve in millicoulombs per absorptie (= extinktie) eenheid.

17.2 is het elektrochemisch ekwivalent in millicoulombs van 1 /uL O_2. V is het gefilteerde volume in liters.

De potentiële respiratie van 2 ml Chlamydomonassuspensie bedraagt in deze drie metingen dan resp. 13.9, 11.5 en 9.4 /u L O_2, d.w.z. zo'n faktor 3 - 4 hoger dan in de Gilson gemeten werd.

De resultaten van de twee fotosynthesevaatjes zijn in Fig. 7 weergegeven. In de eerste twee uur werd er onder de lichtkondities van het lab. gewerkt, met dien verstande dat het raam (op het noorden) m.b.v. een balastore afgeschermd was en de TL-verlichting niet brandde. Bij deze lage lichtintensiteit was er een nettoproduktie, die aan de regressielijn $y = 0.092 x - 0.78$ voldeed; m.a.w. per uur wordt er 5.6 /u L O_2 gevormd. De O_2-konsumptie, gemeten met de Gilson, bedroeg 3.2 /u L, zodat er bruto 8.8 /u L geproduceerd wordt. Dit impliceert dat de eigen behoefte grofweg 35 % van de produktie onder deze lichtomstandigheden is.

Als na twee uur de fotosyntheseverlichting aangezet wordt, krijgt men een netto O_2-produktie die zeer fraai aan het beeld van een logistische kurve voldoet. De eerste twintig minuten is er een lineaire verloop (korr.koëf. r = 0.97), waarvoor de regressiefunktie $y = 1.37 x + 9.70$ berekend werd, hetgeen neerkomt op een netto-produktie van ca. 82 /u L O_2/hr; bruto, dus incl. de donkerrespiratie, is dit 85 /u L. De donkerrespiratie is dan nog maar enkele procenten van de produktie.

De hoge waarden, waarschijnlijk de maximale produktiesnelheid onder deze temperatuur- en lichtkondities, duiden er wel op dat de cellen de proef goed kunnen doorstaan. Binnen een uur gaat de produktie echter al afnemen; in de periode tussen 4 en 8 uur na het aanzetten van de verlichting is de produktie nauwelijks meer groter dan de konsumptie.

VI. DISKUSSIE

Methodiek

De grote lijnen werden bepaald door de artikelen van PACKARD (1971) en PACKARD et. al. (1971). De vele kleinere technische details moesten veelal zelf worden uitgevonden (zie de mothodiekbeschrijving op pg. 22 e.v.).

Op enkele belangrijke punten is van de beschrijving van PACKARD afgeweken. In de eerste plaats werd bij het potteren met een glazen stamper gewerkt, omdat zoals vermeld het onmogelijk was met de door PACKARD genoemde Teflon-stamper te homogeniseren. Kennelijk gebruikte hij een geschikter type dan de TRI-R; in elk geval had hij beter het merk of type kunnen vermelden.

In de tweede plaats is er een wijziging in de kontrolereaktie aangebracht. Een kontrole moet zoveel mogelijk identiek verlopen aan de echte reaktie. Dit is niet het geval, indien men i.p.v. 3 ml substraatoplossing 3 ml fosfaatbuffer toevoegt. Volgens ALTMAN (1972) reageren NADH en NADPH "langzaam" met INT in een reageerbuis. Bovendien kan de van nature aanwezige bakterieflora in de buis, de vloeistoffen en het filter mogelijk voor enige respiratieaktiviteit zorgen. De kontrolereaktie dient ervoor dit soort fouten in een bepaling te korrigeren, maar daarvoor is dan wel de aanwezigheid van succinaat, NADH en NADPH nodig. De kleur van de kontroles varieerde van vrijwel helder tot lichtroze, hetgeen bevestigt, dat er altijd wel enige "blanko-aktiviteit" bestaat.

Homogenisatie

Uit de resultaten van de proeven, waarin homogenisatiewijze en de potterbuis de variabelen waren, is gebleken dat noch een invloed van de behandeling, althans in de range van 4 tot 16 keer op en neer

bewegen, noch van de buis aangetoond kon worden. De F-waarden waren bovendien zo klein, dat uitbreiding van het aantal proefseries weinig zinvol leek.

De buizen zijn dus goed gestandaardiseerd gemaakt en kunnen door elkaar gebruikt worden. Dat geen signifikante invloed van de homogenisatiebehandeling aangetoond kon worden, is een indikatie dat het stukmaken van het filter + seston, waarbij alle deeltjes reeds tussen de glaswanden doorgeperst worden, en eventueel de eerste drie keer op en neer bewegen, bij de potterbuismethode reeds een maximale enzymaktiviteit geeft. Het 16 keer op en neer gaan geeft nog geen nadelige effekten; te lang doorgaan kan nl. verlaging van de aktiviteit tot gevolg hebben.

Bij de rest van de proeven werd steeds 8 x op en neer aangehouden; deze keuze is echter volstrekt arbitrair.

De reproduceerbaarheid van het deel van de proef volgend op de homogenisatie, gemeten naar de verschillen in duplowaarden, bedraagt 3.5 $\pm$ 3.0 %. De variatie voor de gehele bepaling was in de 4 - 6 - 8x reeks 11.1 $\pm$ 5.2 %. Zo'n 30 % hiervan kan dus verklaard worden uit variaties in de INT-reduktie en de extinktiebepaling. Potentiële foutenbronnen liggen verder in het afmeten van het te filtreren watervolume en verschillen in vochtgehaltes van de filters. De eerste fout zal hooguit 0.5 % bedragen en meestal lager liggen. Door dat de drie filtraties steeds synchroon liepen, waardoor de onderdruk overal gelijk was, en de filtraties vrijwel tegelijk beëindigd werden, is de tweede fout erg klein. Hetzelfde geldt ook voor pipetteerfouten. Een andere systematische fout ligt in het opzuigen van het formazan; er blijft altijd een klein restje achter. Per buis kan dit iets varieren, maar daar het om minieme volumina gaat, is het percentueel bijna verwaarloosbaar.

Verder treedt vooral bij hogere formazankoncentraties enige absorptie aan het filtermateriaal op. Dit kan geverifieerd worden door opnieuw solutiemiddel toe te voegen, te extraheren en te centrifugeren. De kleur van het tetrachloorethyleen is dan roze. In hoeverre de absorptie variabel is of een (erg klein) percentage van de formazankoncentratie, is niet nagegaan. Van betekenis kan deze fout echter niet zijn.

De mogelijkheid, dat er variaties in homogenisatie-effektiviteit optreden, kan niet uitgesloten worden. Een aanwijzing hiervoor is het feit, dat bij toenemend gebruik van de potterbuizen de variatie-parameters in grootte toenemen. In de 8 - 12 - 16x reeks is de spreiding in de duploverschillen signifikant groter dan in de 4 - 6 - 8x reeks; hetgeen erop kan duiden dat de aktiviteit in het homogenaat niet helemaal kontinu verdeeld is, bv. door het optreden van kleine filterpropjes. Dit spreidingsverschil kan echter nog aan twee extreme waardes worden toegeschreven.

Hetzelfde verschijnsel doet zich voor bij de variatie voor de gehele bepaling. Zowel het maximale verschil tussen de steekproeven uit dezelfde watermassa, als de spreiding hierin, is in de tweede reeks signifikant groter. Maar ook hier kan dit op het konto van twee uitbijters geschreven worden.

De variatiewaarde voor de gehele bepaling is in proef II (ultrasoon trillen) opgelopen tot 25.7 $\pm$ 20.9 %. De verschillen, zowel in de gemiddelde waarde als in de variantie ervan, met de eerste reeks zijn hoogst signifikant. Laat men ook hier één extreme uitbijter weg, dan wordt het gemiddelde verschil tussen de steekproeven uit dezelfde watermassa 18.8 $\pm$ 10.7 %. Getoetst t.o.v. de gekombineerde waarden (zonder uitbijters) van de twee reeksen in proef I, dan blijkt de variantie van het gemiddelde nog steeds

signifikant groter te zijn ($F = 4.61$, $p = 0.006$), maar het verschil in gemiddelde waarde niet meer (WILCOXON : $u = 1.09$), ook niet als alleen tegen de eerste reeks getoetst wordt ($u = 1.46$).

In elk geval neemt bij toenemend gebruik van de potterbuizen de variantie van het gemiddelde maximale verschil tussen gelijksoortige steekproeven toe, en waarschijnlijk deze variatie-index zelf ook. Het optreden van uitbijters kan op zich zelf reeds een symptoon zijn van "ouderdom" van de buis.

Slijtage van de potterbuis, waardoor de speling tussen stamper en buiswand vergroot wordt, lijkt de enige oorzaak voor de variatietoename. Bij potterbuizen die reeds een tijdje in gebruik waren, "zwabberden" de stampers in de buizen. Dat dit van invloed is op het homogeniseren blijkt uit het feit, dat de filters steeds minder goed stukgemaakt werden. M.a.w., er ontstaat een diskontinue verdeling van aktiviteit in het homogenaat; de grotere variatie kan hieraan toegeschreven worden. De stukjes filter gaan ook meer en meer het pipetteren belemmeren.

Het is mogelijk, dat de homogenisatie-efficiëntie zelf ook afneemt. Dit kon echter niet aangetoond worden. In één steekproef die nog uitgevoerd kon worden, werd vrijwel geen verschil tussen versleten en nieuwe buizen gevonden; het water was toen echter erg rijk aan grote diatomeeën, zoals Coscinodiscus sp., die makkelijk te homogeniseren zijn. Een herhaling van deze proef verdient aanbeveling.

PACKARD (1971) vond bij de aktiviteitsbepaling bij replica's van een Skeletonema costatum homogenaat (een diatomee) een standaarddeviatie van $\frac{1}{4}$ %; op het 5 % signifikantiegebied was dit 1 %. "This error will be larger, when filtering is considered". Hoe groot de totale fout dan wordt, geeft hij echter niet op.

De standaarddeviatie in onze bepalingen bedroeg ruim 3 %; hoewel wat groter dan bij PACKARD, kan toch gesteld worden dat de INT-reduktie en extinktiemeting goed gestandaardiseerd verlop. Een vergelijking van de nauwkeurigheid van de gehele methode kan dus niet gegeven worden.

Eén minuut ultrasoon trillen bleek gemiddeld wel een vergroting van ca. 9 % van de formazanproduktie tot gevolg te hebben, welke signifikant was. Gehoopt werd dat ultrasoon trillen de grotere variatie in de metingen t.g.v. slijtage der potterbuizen weer wat zou verkleinen. In die zin heeft de extra behandeling echter geen waarde. De toename in extinktie kan waarschijnlijk toegeschreven worden aan desintegratie van (een deel van) de bakterieflora, die door zijn kleine afmetingen in de potterbuis vermoedelijk vrij goed heel blijft.

Nu kan het zijn, dat 1 minuut trillen te kort is, maar er zijn sterke aanwijzingen, dat verlenging niet effektief zal zijn. Op de afdeling Primaire Produktie van het NIOZ wordt de ultrasone desintegrator voor chlorophyllbepalingen gebruikt. Op een filter wordt een laagje $MgCO_3$ aangebracht en vervolgens hierover een watermonster afgezogen; het $MgCO_3$ met seston kan nu eenvoudig van het filter geschraapt worden, waarna het vervolgens in een 90 % acetonoplossing ultrasoon getrild wordt (5 min.). De cellen werden hierdoor vernield en het naar buitentredende chlorophyll door het aceton geëxtraheerd, waarna centrifugering en bepaling in de fotometer kan plaatsvinden. Gebleken is, dat cellen met een stevige celwand, speciaal Scenedesmus, hiermee niet of slechts gedeeltelijk kapotgemaakt kunnen worden (med. G. Cadée).

DERENBACH (1969) vermeldt dat de standaardmethode voor chlorophyllbepaling in het SCOR - UNESCO handboek 1966 berust op

het 1 min. lang bij 500 Omw./min. potteren (met een teflon-stamper) van een filter, waarna het homogenaat 15 min. geëxtraheerd wordt met 90 % aceton.

Dit vormde voor mij een reden alsnog een vergelijkend proefje op te zetten. Zes monsters van 1.5 L uit hetzelfde zeewater werden gefiltreerd. Drie filters (zonder $MgCO_3$) werden in 90 % aceton op de bekende wijze gepotterd en de drie andere op de boven beschreven wijze met ultrasoon trillen (de chlorophyllbepaling werd verricht door J. Hegeman). Het gemiddelde van de pottermethode was 3.71 $\pm$ 0.10 μg chlorophyll/L en ultrasoon 3.19 $\pm$ 0.16; een gemiddeld verschil van 16 %.

Naderhand werd door G. Cadée nog eens dezelfde proef met IJsselmeerwater (waarin veel Scenedesmus voorkomt) gedaan, waarbij echter slechts 1 bepaling volgens beide methodes verricht werd. Het verschil ten gunste van de pottermethode was toen veel kleiner : 3 %.

De tendens lijkt dus aanwezig, dat homogenisatie met potterbuizen effektiever is dan ultrasone trilling, wat betreft het desintegreren van phytoplankton. De "moeilijke" soorten gaan bij het potteren beter stuk.

Als bovengenoemde tendens inderdaad juist is, dan betekent dit, dat de op het NIOZ in zwang zijnde methode resultaten geeft, die beïnvloed worden door de populatiesamenstelling. Dit betekent een vrij ernstige foutenbron.

Met de potterbuizen is de homogenisatie van de wat grotere organismen volledig, maar ook hier blijft een aanzienlijk deel van de zeer kleine, met een stevige celwand toegeruste soorten wel heel. Zo gaat de frekwent in een watermonster voorkomende Coelastrum vrijwel totaal kapot, en blijft er van de even grote Scenedesmus een

flink deel in leven. De bovengenoemde foutenbron speelt dus ook, zij het waarschijnlijk in mindere mate, bij de respiratiebepaling een rol.

Deze belangrijke fout moet PACKARD ook gemaakt hebben, temeer daar hij met de veel zachtere teflon-stampers werkte. Daar deze zeer kleine organismen vaak de "bulk" van de totale produktie en respiratie voor hun rekening nemen (GIESKES, 1972; POMEROY & JOHANNES, 1966), geeft dit bovendien twijfel aan de betrouwbaarheid van de gemeten waarden.

DERENBACH (1969) onderzocht m.b.v. een fluorescentiemikroskopische analyse het sediment in het met aceton geëxtraheerde homogenaat van een potterbuis. Hij vond eveneens veel intakte cellen, hetgeen dus met mijn eigen waarnemingen overeenstemt. DERENBACH stelt een nieuwe chlorophyllbepalingsmethode voor, waarbij de homogenisatie d.m.v. een CO_2 gekoelde Braun celhomogenisator plaatsvindt. Hierbij wordt de buffer met het te verkleinen materiaal bij een frekwentie van 4000 Hz met glaspareltjes geschud. De optimale werkwijze wordt bepaald door variatie in de techniekonderdelen glasparelgrootte en - hoeveelheid, homogenisatietijd en extraktietijd.

De homogenisatietijd bij gewone planktonsoorten bedroeg ca. $\frac{1}{2}$ minuut, bij dikwandige 1 min. (kontroleerbaar per mikroskoop). Deze methode bleek een vrijwel volledige chlorophyllextraktie op te leveren

In dezelfde tijdsrange kan men ook gist- en bakteriecellen kapot maken (MERKENSCHLAGER et. al., 1957). Het voordeel van celhomogenisatie m.b.v. glaspareltjes is, naast de vrijwel 100 % efficiëntie, dat ook de bakteriële fraktie van het seston kapot gaat. Zelfs als men i.v.m. de planktonhomogenisatie niet de voor bakteriën meest optimale glaspareltjesgrootte gebruikt, dan krijgt men volgens MERKENSCHLAGER et. al. (1957), die dit type celhomogenisator

ontwikkelden en op zijn bruikbaarheid voor mikrobiologisch werd testten, in 1 - 2 min. van de moeilijkste soorten toch nog 70 % stuk.

Een nader onderzoek naar de bruikbaarheid van deze methode voor ons type werk verdient dan ook sterke aanbeveling.

Dat homogenisatie noodzakelijk is, werd door CURL & SANDBERG (1961) en EPPLEY et. al. (1969) aangetoond. Indirekt geschiedt dit ook door PATTERSONS et. al. (1969). Zij inkubeerden monsters aktief slib (van zuiveringsinstallaties) met een tetrazoliumzout om direkt de respiratie te meten. Zij noemen echter als nadeel van deze methode de zeer lange inkubatietijd en de wisselvallige resultaten. Doordat tetrazoliumzouten slecht door de celmembraan gaan, en mogelijk de doorlaateigenschappen per organisme verschillen, liggen de bezwaren van PATTERSON et. al. voor de hand. Direkte in situ metingen zijn nog niet goed mogelijk. Met homogenisatie kan de tetrazoliummethode echter ook in deze toegepaste werkingsfeer zeer belangrijk gaan worden (JANNASCH, 1971).

Anderzijds is het ook niet juist, dat voor de analyse van de E.T.S. aktiviteit (en) de desintegratie van zowel de celmembraan als van de mitochondriemembraan vereist is, zoals PACKARD (1971) stelt. Gezien de barrierefunktie van de celmembraan (zie boven) moet deze wel stuk; het valt echter te betwijfelen of men door potteren de mitochondriemenbraan stukkrijgt : de gemiddelde grootte van een mitochondrie is 1.5 bij 0.5 μ en bovendien is de membraan stevig en flexibel (GREEN, 1965).

Dat deze niet of nauwelijks stukgaat wordt bevestigd door het feit, dat EPPLEY et. al. (1969) en PACKARD (1971) bij het uittesten van een geschikte buffer, de hoogste aktiviteit vonden bij gebruik van een fosfaatbuffer; hierin ligt tevens de konklusie gesloten dat de membraan niet stuk hoeft. Fosfaationen veroorzaken nl. een

zwelling van de poriën in de mitochondriemembraan, waardoor de permeabiliteit toeneemt. INT molekulen, waarvan reeds een deel onder normale kondities de membraan kon passeren, kunnen nu vrijgelijk binnenkomen (ALTMAN, 1972).

IJKING INT

Uit de gegevens van PACKARD & HEALY (1968) kondon voor twee 0.2 % INT oplossingen resp. de regressielijnen $y = 0.0144\ x + 0.050$ en $y = 0.0151\ x + 0.032$ berekend worden. Normaliseren we onze ijklijnen ook op 8.0 ml, dan worden deze $y = 0.0133\ x - 0.029$ en $y = 0.0143\ x + 0.058$. De laatste hiervan is vrijwel identiek aan de eerste van PACKARD & HEALY. De andere ligt lager maar hier is het aantal meetpunten kleiner en is een veel kortere ladingsrange onderzocht; in zijn totaliteit kan de overeenkomst daarom bevredigend geacht worden. De konklusie van beide auteurs, dat voor alle nieuw klaargemaakte oplossingen een ijklijn gemaakt moet worden, kan volledig onderschreven worden. Dat er verschillen optreden is ook niet zo verwonderlijk, daar de op pg. 12 beschreven aanmaakprocedure de nodige ruimte voor koncentratievariaties geeft.

De gemeten extinkties vertonen echter soms grote onregelmatigheden. Bij de eerste ijkserie van oplossing A voldoen de meetpunten nog goed aan de regressielijn : de gemiddelde afwijking bedraagt 3.7 ± 2.0 %. Bij de tweede serie is dit reeds veel hoger 11.8 ± 11.8%; de afwijking bij serie I van oplossing B ligt in dezelfde orde van grootte, 10.9 ± 8.7 %.

PACKARD & HEALY vonden een waarde van ± 0.07 %. Nu is het niet onmogelijk, dat zij de resultaten van hun beste ijkingen gegeven hebben, maar desondanks zijn voor een coulometrische titratie afwijkingen van gemiddeld 11 % zonder meer te hoog. De oorzaak hiervan

is niet helemaal duidelijk. De stroomsterkte gedurende de proef was altijd zeer konstant, hetgeen op een gelijkmatige reduktie wijst.

Mogelijk ligt de oorzaak in het anodevaatje. De provisorische reparatie d.m.v. het rubberstopje was niet altijd helemaal effektief, zodat er soms wat anodevloeistof uitgelopen was. Dit kan pH verlagend werken. Voor de INT reduktie bestaat een vrij nauw pH optimum, ca. 7.6 (CURL & SANDBERG, 1961), terwijl beneden de 6.0 de formazanvorming niet meer kwantitatief verloopt en het hoofdprodukt vaak gedeeltelijk kleurloos wordt (ALTMAN, 1972).

PACKARD & HEALY benadrukken de betekenis van het gefrit glas om de diffusie van elektrolyseprodukten tegen te gaan; om wat voor produkten het gaat en wat hun storende invloed is, wordt echter niet vermeld. Mogelijk is door de konstruktiefout nu wel diffusie mogelijk. In elk geval zijn onregelmatigheden t.g.v. pH veranderingen niet ondenkbaar. Het verschijnsel van de zeer hoge en onregelmatige extinkties in het eerste deel van serie II (opl. B) kan hierdoor echter niet veroorzaakt zijn. Een verklaring kan hier niet voor worden gegeven.

In ieder geval dient het anodevaatje hersteld te worden, waarna door het maken van enige nieuwe ijkseries de variatie opnieuw gekontroleerd kan worden.

Vergelijking Gilson Respirometer en Packard-methode

De drie metingen volgens de Packard-methode, resp. 13.9, 11.5 en 9.4 μ L/hr, vertonen een vrij grote spreiding. Het aflopen van de aktiviteit korrespondeert met langere wachttijden voor de inkubatie. Men zou zich nu kunnen voorstellen, dat de enzymkoncentraties zo hoog waren, dat er onvoldoende buffermateriaal (PVP, glutathion) aanwezig is, waardoor er bij toenemende wachttijd in de proef een deel

van de enzymsystemen geïnaktiveerd raakte.

Deze verklaring is om twee redenen onaannemelijk. Ten eerste hebben PACKARD et. al. (1971) meermalen hogere waarden gevonden, zodat verondersteld kan worden, dat hun bufferoplossing daarop berekend is. In de tweede plaats zouden, indien er een tijdeffekt bestaat, de duplo's van een homogenaat ook ver uit elkaar moeten liggen (1 min. verschil tegen gemiddelde 2 min. tussen twee monsters). Hiervan is echter geen sprake.

Mogelijk ligt de verklaring in onvoldoende menging in de algekulture, hetgeen impliceert dat het schudden vooraf niet effektief genoeg geweest is.

Ook de Gilsonmetingen verlopen tamelijk onregelmatig. Gezien het synchrone patroon in alle vier vaatjes is het aannemelijk, dat er een gemeenschappelijke oorzaak voor de fluktuaties is; het meest voor de hand liggen temperatuurschommelingen van de lucht. Daar een flink deel van de luchtslang van elke eenheid buiten de bufferende invloedssfeer van het waterbad valt, beïnvloeden temperatuurveranderingen het volume, per ^{o}C ca. $5/u$ L (med. G. v.d. Hoek). Door het geringe O_2-verbruik hebben kleine temperatuurfluktuaties relatief een vrij grote invloed. Daar de verwarming de labtemperatuur ongeveer op een bepaalde waarde houdt, komt het verkregen patroon, schommelingen om een rechte lijn, overeen met wat men zou kunnen verwachten.

De resultaten met de Gilson bevestigen dat de Packard-methode goed werkt. Dat de waarden bij de laatste aanzienlijk hoger liggen, is te verwachten, omdat hier de potentiële respiratie wordt gemeten; waarschijnlijk liggen de werkelijke waarden nog hoger, aangezien niet alle cellen gehomogeniseerd zijn. Bij intakte organismen drukken beperkende faktoren (zie pg. 63) de O_2-konsumptie.

van de enzymsystemen geïnaktiveerd raakte.

Deze verklaring is om twee redenen onaannemelijk. Ten eerste hebben PACKARD et. al. (1971) meermalen hogere waarden gevonden, zodat verondersteld kan worden, dat hun bufferoplossing daarop berekend is. In de tweede plaats zouden, indien er een tijdeffekt bestaat, de duplo's van een homogenaat ook ver uit elkaar moeten liggen (1 min. verschil tegen gemiddelde 2 min. tussen twee monsters). Hiervan is echter geen sprake.

Mogelijk ligt de verklaring in onvoldoende menging in de algekulture, hetgeen impliceert dat het schudden vooraf niet effektief genoeg geweest is.

Ook de Gilsonmetingen verlopen tamelijk onregelmatig. Gezien het synchrone patroon in alle vier vaatjes is het aannemelijk, dat er een gemeenschappelijke oorzaak voor de fluktuaties is; het meest voor de hand liggen temperatuurschommelingen van de lucht. Daar een flink deel van de luchtslang van elke eenheid buiten de bufferende invloedssfeer van het waterbad valt, beïnvloeden temperatuurveranderingen het volume, per ^{o}C ca. 5 μ L (med. G. v.d. Hoek). Door het geringe O_2-verbruik hebben kleine temperatuurfluktuaties relatief een vrij grote invloed. Daar de verwarming de labtemperatuur ongeveer op een bepaalde waarde houdt, komt het verkregen patroon, schommelingen om een rechte lijn, overeen met wat men zou kunnen verwachten.

De resultaten met de Gilson bevestigen dat de Packard-methode goed werkt. Dat de waarden bij de laatste aanzienlijk hoger liggen, is te verwachten, omdat hier de potentiële respiratie wordt gemeten; waarschijnlijk liggen de werkelijke waarden nog hoger, aangezien niet alle cellen gehomogeniseerd zijn. Bij intakte organismen drukken beperkende faktoren (zie pg. 63) de O_2-konsumptie.

Het fotosyntheseproefje geeft bij een vrij zwakke lichtintensiteit een Prod./Resp. verhouding van 2.6. De potentiële kapaciteit van het fotosynthesesysteem wordt geïllustreerd door de geweldige produktie in de eerste 20 min. na het aanzetten van de verlichting. Dit is tevens een indikatie, dat de cellen in goede konditie zijn tijdens de metingen. Beperkende faktoren doen de produktie snel afnemen, waardoor de theoretisch te verwachten logistische kurve ontstaat.

Kanttekeningen bij de methode

De met de Packard-methode verkregen resultaten zijn, bij gebruik van weinig gesleten potterbuizen, goed reproduceerbaar. Verbetering kan mogelijk verkregen worden door in de vaten met zeewater een roerder te plaatsen, zodat de homogeniteit van de monsters meer gegarandeerd is.

Een belangrijk nadeel vormt de lange duur van een bepaling. Een meting met de Gilson strekt zich ook over vele uren uit, maar als de proef eenmaal gestart is, heeft men er hooguit 10 min. per uur werk aan. Een zuurstofelektrode werkt helemaal automatisch. Bij de Packard-methode is men echter kontinu bezig.

Getracht is de efficiëntie op te voeren door per serie 6 monsters te bewerken. Met de huidige filterinstallatie betekent dit twee keer achter elkaar filtreren. Men moet er echter zorg voor dragen, dat het gehomogeniseerde materiaal vrij snel verwerkt wordt, daar en anders aktiviteitsafname gaat optreden (PACKARD, 1971). Daarom is deze uitbreiding niet aan te bevelen, als het water erg trobel is, daar het filtreren van minimaal 1 L dan vaak een half uur duurt. Een vergroting van de filterinstallatie tot zo'n zes koppen is daarom gewenst. Verder opvoeren van het aantal per serie

is gezien de gekompliceerdheid van start-, schud-, en stopprocedures tijdens de inkubatie niet haalbaar; bovendien loopt anders het tijdsverschil tussen het starten van de eerste en de laatste buis te veel op. Bij een taakverdeling in een ploeg mensen zou de productiviteit per man verhoogs kunnen worden.

Bij het gebruik van glazen potterbuizen is het aan te bevelen, deze hooguit voor 15 bepalingen te gebruiken. Dit en het gebruik van dure chemicaliën maken, dat de prijs per bepaling hoog is, ca. f 4,--. Daartegenover staat, dat de benodige apparatuur niet specifiek genoemd kan worden, terwijl dit bij andere methodes vaak wel het geval is (Gilson).

Een ander belangrijk punt is de bruikbaarheid op zee. De watermonsters mogen niet te lang staan, minder dan 5 uur bij de in situ of een lagere temperatuur, om aantalsveranderingen en bakterieontwikkeling voor te zijn (PACKARD et. al 1971). Dit betekent dat de homogenisatie en de INT reduktie kort na het monsteren moeten plaatsvinden. Vooral het potteren zal op een schip grote problemen opleveren. In dat geval zal met een beveiligde potterinstallatie (zoals de Braun Homogenisator), waarbij handwerk niet meer voorkomt, of, indien bruikbaar, met de glaspareltjesmethode gewerkt moeten worden. De INT reduktie levert bij gebruik van een automatisch pipet weinig problemen op.

Het geëxtraheerde formazan is, indien goed afgesloten, in een donkere en koele omgeving geruime tijd houdbaar (CURL & SANDBERG, 1961), zodat extinktiemetingen eventueel op het land kunnen plaatsvinden. Bij kalm weer is het centrifugeren en het meten in de spektrofotometer misschien ook aan boord mogelijk.

Indien men de bezwaren, die het homogenisatiesysteem nog met zich meebrengt, kan ondervangen, biedt de methode van Packard in

principe goede mogelijkheden voor respiratiekinetiekonderzoek. Het werk is totnutoe uitsluitend oceanisch geweest; de biomassa en de omstandigheden zijn hier tamelijk stabiel. De vraag is, en dat is een probleem voor alle respiratiebepalingsmethodieken, in hoeverre in kustwateren en estuarie gewerkt kan worden, waar de biomassa en populatiesamenstelling in een kort tijdsbestek sterk fluktueren (HICKEL, 1972; KÜHL & RHEINHEIMER, 1968).

Voordat men echter aan dit soort problematiek kan beginnen, dient eerst een essentieel theoretisch probleem opgelost te worden. De vraag blijft nl. hoe de gemeten potentiële of maximale aktiviteit tot in situ waarden omgerekend kunnen worden. Volgens PACKARD et. al. moet als omrekeningsfaktor de "respiratory control ratio" (RCR) gebruik worden, de verhouding tussen O_2-konsumptiesnelheid bij maximale ETS aktiviteit en het verbruik, wanneer het ETS gelimiteerd wordt door ADP. Deze verhouding varieert per organisme en met de methode van enzympreparatie.

Desondanks waagden PACKARD et. al. een poging. Uit litteratuurgegevens haalden zij een schatting van 10 voor de RCR. Hiervan uitgaande berekenden zij de O_2-konsumptie in een aantal dieptelagen in de Perustroom. Zij achten hun waarden vergeleken met die van POMEROY & JOHANNES (1968), die in hetzelfde gebied gewerkt hebben, laag. Maakt men beide series gegevens vergelijkbaar, dan blijkt het verschil een faktor 100 te bedragen! De P/R verhouding in de waarden van PACKARD et. al. ligt in de range van 50 tot 299, hetgeen onwaarschijnlijk hoog is. Beide feiten duiden erop, dat de berekende respiratie veel te laag is.

Mogelijk is de RCR te hoog; in dit verband is ook het aandeel in de O_2-konsumptie van het microsomale ETS van belang, omdat de RCR niet hiervoor gebruikt kan worden. Mede gezien de uitkomst in de

vergelijkende proef met de Gilson respirometer kan dit hooguit een faktor 2 zijn, waardoor de grote verschillen slechts gedeeltelijk verklaard zijn.

Een potentiële fout zit ook in het gebruikt van de exponentiële Arrheniusvergelijking voor het onder één noemer brengen van monsters met verschillende in situ temperaturen. Deze vergelijking is korrekt als die voor één enzymreaktie gebruikt wordt; maar in de eerste plaats wordt de aktiviteit van meerdere enzymen gemeten en in de tweede plaats kunnen er interspecifieke verschillen bestaan (PATTERSON et. al., 1969).

Vermoedelijk is er ook nog een methodische fout, die bijdraagt tot de onderschatting van de in situ respiratie. De "bulk" van de ademhaling in de Perustroom komt voor rekening van ultraplankton, $<10\,\mu$ (POMEROY & JOHANNES, 1968). Potteren met een teflon-stamper zou wel eens een groot deel hiervan intakt kunnen laten.

Door deze kombinatie van faktoren is de poging om uit potentiële respiratie in situ waarden te berekenen geen sukses. Wat betreft beide theoretische problemen, een formule voor het temperatuureffekt kan misschien berekend worden uit proeven, waarbij een temperatuur-reeks met homogenaten van vergelijkbare monsters gemaakt wordt. De bepaling van de RCR ligt wel wat moeilijker. Een eerste aanzet kan misschien onderzoek aan wat grotere planktonorganismen zijn, waarbij de respiratie nog met een zuurstofelektrode te meten is. Belangrijk is ook te weten in welke mate RCR waarden van de populatiesamen-stelling afhangen. Als de variatie hierin te groot blijkt te zijn, dan kan het bepalen van in situ waarden uit de potentiële respiratie wel eens een ondoenlijke zaak worden.

DANKBETUIGING

In de eerste plaats wil ik J.H. Vosjan en G. v.d. Hoek bedanken voor de prettige samenwerking en hun hulp, waardoor vooral de inwerkperiode aanzienlijk vereenvoudigt werd. G. v.d. Hoek bovendien voor het maken van de ontwerptekening voor de elektrolysecel en zijn hulp bij de proef met de Gilson Respirometer.

Verder wil ik graag R. Manuels, A. Niënkemper, IJ. Pauptit, J. Rommets en D. Spaargaren bedanken voor het uitlenen van voor de proeven essentiele apparatuur, G. Cadée en J. Hegeman voor het helpen determineren van planktonsoorten en voor hun aandeel in de vergelijkende chlorophyllbepalingen, H.G. Fransz voor een statistisch advies en F. Eygenraam voor het maken van komputerprogramma's.

VII. LITTERATUUR

ALEEM, A.P., 1955. Measurements of planktonic populations by triphenyltetrazolium chloride. - Kieler Meeresforsch. 11 : 160-173.

ALTMAN, F.P., 1972. An introduction to the use of tetrazolium salts in quantitative enzyme cytochemistry. - Koch Light Lab. Ltd. Colnbrook, Bucks., England. 1-45.

BARNES, L.A. & E.E. COLIAS, 1958. Some considerations of oxygen utilization rates in Puget Sound. - J. mar. Res. 17 : 168-180.

BANOUB, M.W. & P.J. Le B. WILLIAMS, 1972. Measurements of microbial activity and organic material in the western Mediterranean Sea. - Deep Sea Res. 19 : 433-443.

CARLBERG, S.R. (ed.), 1972. New Baltic Manual. With methods for sampling and analysis of physical, chemical and biological parameters. Coop. Res. Report, Int. Council for Explo. of the Sea, Copenhagen. Series A no. 29 : 1-145.

CARRIT, D.E. & J.H. CARPENTER, 1966. Comparison and evaluation of currently employed modifications of the Winkler method for determining dissolved oxygen in seawater; a NASCO Report. - J. mar. Res. 24 : 286-318.

CURL, H. & J. SANDBERG, 1961. The measurement of Dehydrogenase Activity in Marine Organisms. - J. mar. Res. 19 : 123-138.

DERENBACH, J.B., 1969. Zur Homogenisation des Phytoplanktons für die Chlorophyllbestimmung. - Kieler Meeresforsch. 25 : 166-171.

EPPLEY, R.W., J.L. COATSWORTH & L. SOLORZANO, 1969. Studies of nitrate reductase in marine phytoplankton. - Limnol. Oceanogr. 14 : 194-205.

GIESKES, W.W., 1972. Primary production, nutrients, and size spectra of suspended particles in the southern North Sea Int. Rep. Neth. Inst. dor Sea Res. - 16: 1-39.

GILFILLAN, E., 1972. Reactions of Euphasia pacifica Hansen (Crustacea) from oceanic, mixed oceanic-coastal and coastal waters of British Columbia to experimental changes in temperature and salinity. - J. exp. mar. Biol. Ecol. 10 : 29-40.

GREEN, D.E., 1965. The Mitochondrion. In: D. KENNEDY. The Living Cell Readings from Scientific American, San Francisco: 1-296.

HAGMEIER, E., 1967. Assimilation and dissimilation measurements on plankton of Helgolandwaters. First Eur. Mar. Biol. Symp. - Helgoländer wiss. Meeresunters. 15 : 137-143.

HICKEL, W., 1972. Kurzseitige Veränderungen hydrographischer Faktoren und der Sestonkomponenten in driftenden Wassermassen in der Helgoländer Bucht. - Helgoländer wiss. Meeresunters. 23 : 383-392.

HOBBIE, J.E. & C.C. CRAWFORD, 1969. Respiration corrections for bacterial uptake of dissolved organic compounds in natural waters. - Limnol. Oceanogr. 14 : 528-532.

JANNASCH, H.W., 1971. New approaches to Assessment of Microbial Activity in Polluted Waters. In: R. MITCHELL. Water Pollution Microbiology, New York: 291-303.

KUHL, H & G. RHEINHEIMER, 1968. Veränderungen der Bakterienflora, des Planktons und einiger chemischer Faktoren während einer Tide in der Elbmündung bei Cuxhaven. - Kieler Meeresforsch. 24 : 27-37.

Le BORGNE, R.P., 1973. Etude de la respiration et de l'excretion de phosphore des populations zooplanctoniques de l'upwelling mauritanien (mars - avril 1972). - Mar. Biol. 19 : 249-257.

LEHNINGER, A.L., 1970. Biochemistry. New York: 1-833.

LENZ, J., 1971. Zur Methode der Sestonbestimmung. - Kieler. Meeresforsch. 27 : 180-193.

LONG, E.B. & G.D. COOKE, 1972. A quantitative comparison of pigment extraction by membrane and glass-fiber filters. - Limnol. Oceanogr. 17 : 990-992.

MERKENSCHLAGER, M., K. SCHLOSSMANN & W. KURZ, 1957. Ein mechanischer Zellhomogenisator und seine Anwendbarkeit auf biologische Probleme. - Biochem. Z. 329 : 332-240.

MONTGOMERY, H.A.C., 1967. The determination of biochemical oxygen demand by respirometric methods. - Water Research 1 : 631-662.

PACKARD, T.T., 1971. The measurement of Respiratory Electron-transport Activity in Marine Phytoplankton. - J. mar. Res. 29 : 235-244.

PACKARD, T.T. & M.L. HEALY, 1968. Electrochemical standardization of the dehydrogenase assay used in the estimation of respiration rates. - J. mar. Res. 26 : 66-74.

PACKARD, T.T., M.L. HEALY & F.A. RICHARDS, 1971. Vertical distribution of the activity of the respiratory electron transport system in marine plankton. - Limnol. Oceanogr. 16 : 60-70.

PACKARD, T.T. & P.B. TAYLOR, 1968. The relationship between succinate dehydrogenase activity and oxygen consumption in the brine shrimp, Artemia salina. - Limnol. Oceanogr. 13 : 552-555.

PAMATMAT, M.M. & K. BANSE, 1969. Oxygen consumption by the seabed II. In situ measurements to a depth of 180 m. - Limnol. Oceanogr. 14 : 250-259.

PARKER, R.A. & R. HELM, 1965. The relationship between inorganic phosphate uptake and oxygen consumption by Daphina schødleri Sars. - Ecology 46 : 881-882.

PATTERSON, J.W., P.L. BREZONIK & H.D. PUTNAM, 1969. Sludge activity parameters and their application to toxicity measurements and activated sludge. - Proc. 24th Purdue Industr. Waste Conf. Purdue University, Indiana: 127-154.

POMEROY, L.R. & R.E. JOHANNES, 1968. Occurence and respiration of ultraplankton in the upper 500 meters of the ocean. - Deep Sea Res. 15 : 365-375.

SATOMI, M. & L.R. POMEROY, 1965. Respiration and phosphorus excretion in some marine populations. - Ecolog 46 : 877-881.

SCHRAMM, W., 1966. Kontibuierliche Messung der Assimilation und Atmung mariner Algen mittels der elektrochemischer

Sauerstoffbestimmung. - Helgölander wiss. Meeresunters. - 13 : 275-287.

SOKAL, R.R. & F.J. ROHLF, 1969. Biometry. San Francisco: 1-776.

STEEMEN NIELSEN, E., 1952. The use of radio-active carbon (C^{14}) for measuring organic production in the sea. - J. Cons. perm. int. Explor. Mer 18 : 117-140.

VERBRUGH, A.J., 1966. Elementaire inleiding tot de Fysische Scheikunde Deel I. (4e dr.) Groningen: 1-453.

VON OERTZEN, J.A. & V. MOTZFELD, 1969. Eine Apparatur zur kontinuierlichen Respirationsmessung an marinen Organismen. - Mar. Biol. 3 : 336-340.

WILLIAMS, P.J. Le B. & C. ASKEW, 1968. A method of measuring the mineralization by micro-organisms of organic compounds in sea-water. - Deep Sea Res. 15 : 365-375.

ZEISS jr., F.R., 1963. Effects of population densities on zoöplankton respiration rates. - Limnol. Oceanogr. 8 : 110-115.

Tabel I

De extinktiewaarden per 1.5 L zeewater (gemiddelde van twee duplo's), opgesplitst naar buis en behandeling.

Behandeling	Buis A	Buis B	Buis C	
4-6-8x reeks				
4 x	0.099 0.146	0.177 0.154 0.102 0.102	0.144 0.131 0.121	$4x = 1.176$
	$\Sigma = 0.245$	$\Sigma = 0.535$	$\Sigma = 0.396$	
6 x	0.197 0.136 0.099 0.122	0.107 0.139 0.145	0.139 0.100	$6x = 1.184$
	$\Sigma = 0.554$	$\Sigma = 0.391$	$\Sigma = 0.239$	
8 x	0.145 0.136 0.120	0.150 0.129	0.211 0.105 0.091 0.151	$8x = 1.238$
	$\Sigma = 0.401$	$\Sigma = 0.279$	$\Sigma = 0.558$	
	$\Sigma_A = 1.200$	$\Sigma_B = 1.205$	$\Sigma_C = 1.193$	$\Sigma_{tot.} = 3.598$
8-12-16x reeks				
8 x	0.084 0.105 0.111 0.151	0.085 0.084 0.129	0.118 0.089 0.095	$\Sigma_{8x} = 1.050$
	$\Sigma = 0.450$	$\Sigma = 0.298$	$\Sigma = 0.302$	
12 x	0.111 0.073 0.099 0.085	0.103 0.148	0.102 0.106 0.131 0.066	$\Sigma_{12x} = 1.024$
	$\Sigma = 0.368$	$\Sigma = 0.251$	$\Sigma = 0.405$	
16 x	0.086 0.117	0.089 0.113 0.101 0.150 0.102	0.077 0.093 0.113	$\Sigma_{16x} = 1.041$
	$\Sigma = 0.203$	$\Sigma = 0.555$	$\Sigma = 0.283$	
	$\Sigma_A = 1.021$	$\Sigma_B = 1.104$	$\Sigma_C = 0.990$	$\Sigma_{tot.} = 3.115$

Tabel II

De enzymaktiviteit in een homogenaat indien deze op de gewone manier behandeld is (N) en als deze bovendien 1 minuut ultrasoon getrild is (D). De formazanextinkties zijn herleid tot 1 L zeewater en gegroepeerd per proefserie.

	Extinkties								
N	0.125	0.137	0.099	0.091	0.081	0.094	0.068	0.093	0.100
D	0.135	0.151	0.115	0.096	0.083	0.093	0.087	0.125	0.122
N	0.100	0.106	0.097	0.111	0.095	0.118	0.110	0.107	0.117
D	0.102	0.119	0.105	0.118	0.107	0.119	0.123	0.110	0.127
N	0.070	0.057	0.118	0.069	0.068	0.075			
D	0.077	0.057	0.124	0.076	0.068	0.076			
Met gebruik van nieuwe potterbuizen:									
N	0.088	0.098	0.095	0.079	0.097	0.090			
D	0.092	0.104	0.097	0.097	0.098	0.104			

Tabel III

Ijking van een 0.2 % INT-oplossing (A en B).

	Serie I		Serie II	
	Doorgevoerde lading in millicoulombs	Formazanextinktie (genormaliseerd op 6.0 ml)	Doorgevoerde lading in millicoulombs	Formazanextinktie (genormaliseerd op 6.0 ml)
A	5.4	0.072	5.5	0.076
	10.9	0.152	10.9	0.206
	16.3	0.235	21.8	0.289
	22.1	0.330	27.3	0.428
	27.6	0.452	32.8	0.559
	33.1	0.529	38.2	0.671
	38.6	0.685	43,7	0.694
	44.0	0.761		
B	11.0	0.179	5.5	0.190
	22.0	0.555	10.9	0.668
	32.9	0.627	16.4	0.592
	43.6	0.840	22.0	1.116
	54.6	1.244	27.5	1.307
	65.5	1.398	33.0	1.043
	76.4	1.473	38.5	1.116
	87.3	1.542	44.0	1.428
			55.0	1.275
			64.8	1.438
			86.2	1.856
			108.0	2.106

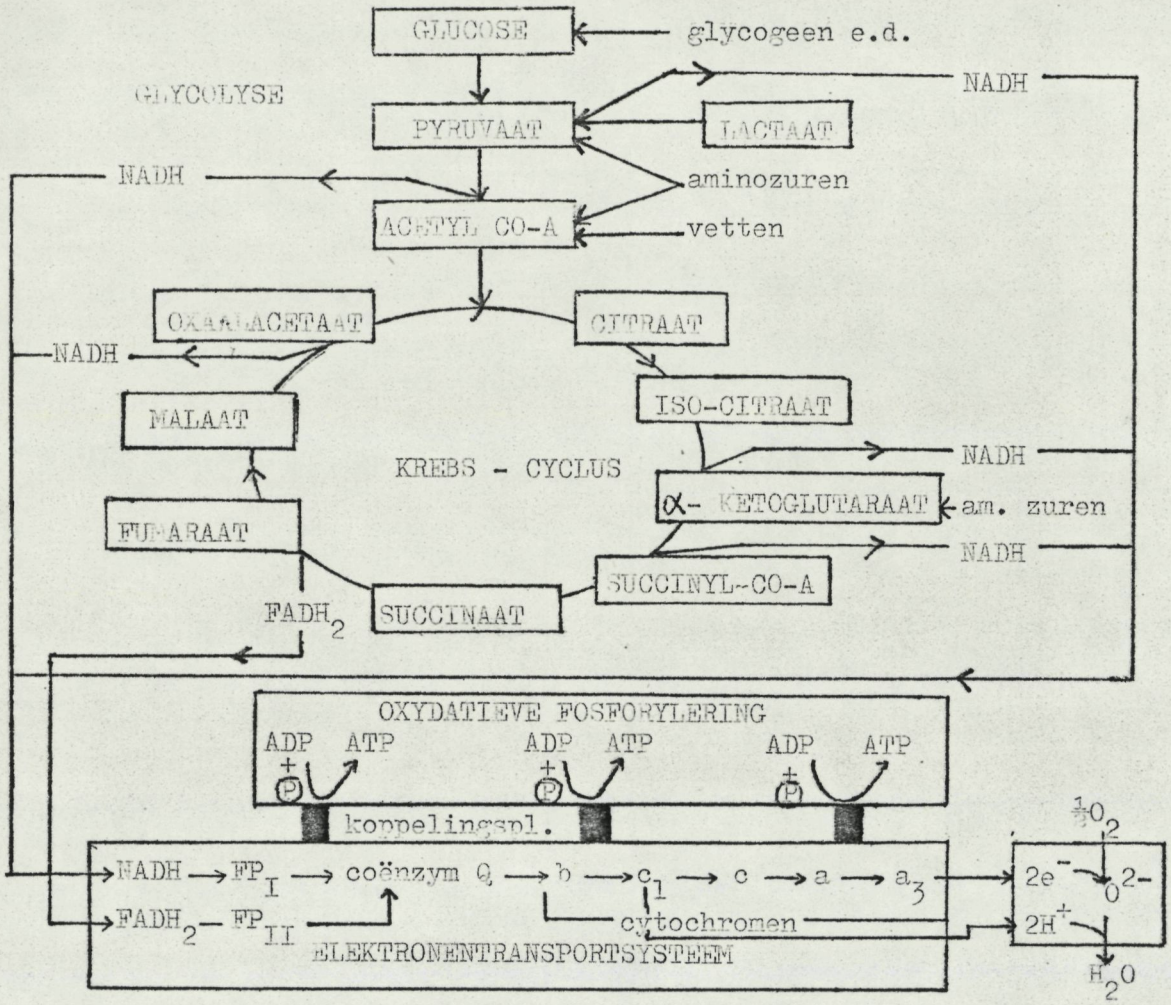


Fig. 1 : De elektronentransportketen der oxydatieve fosforylering en zijn relatie tot de Krebs-cyclus en de glycolyse.(gewijzigd naar PACKARD 1971 (FP = flavoproteïne systeem)

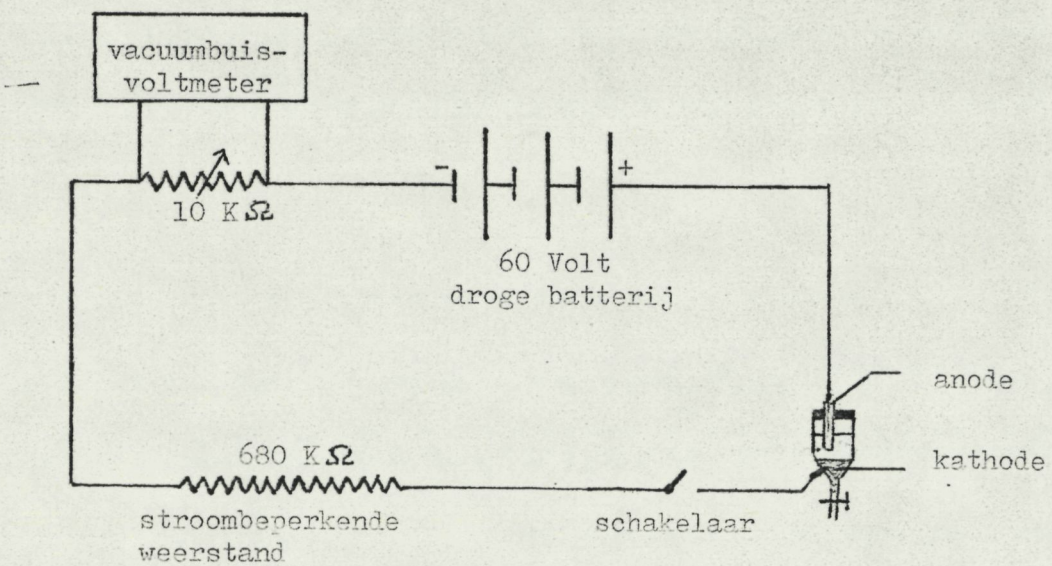
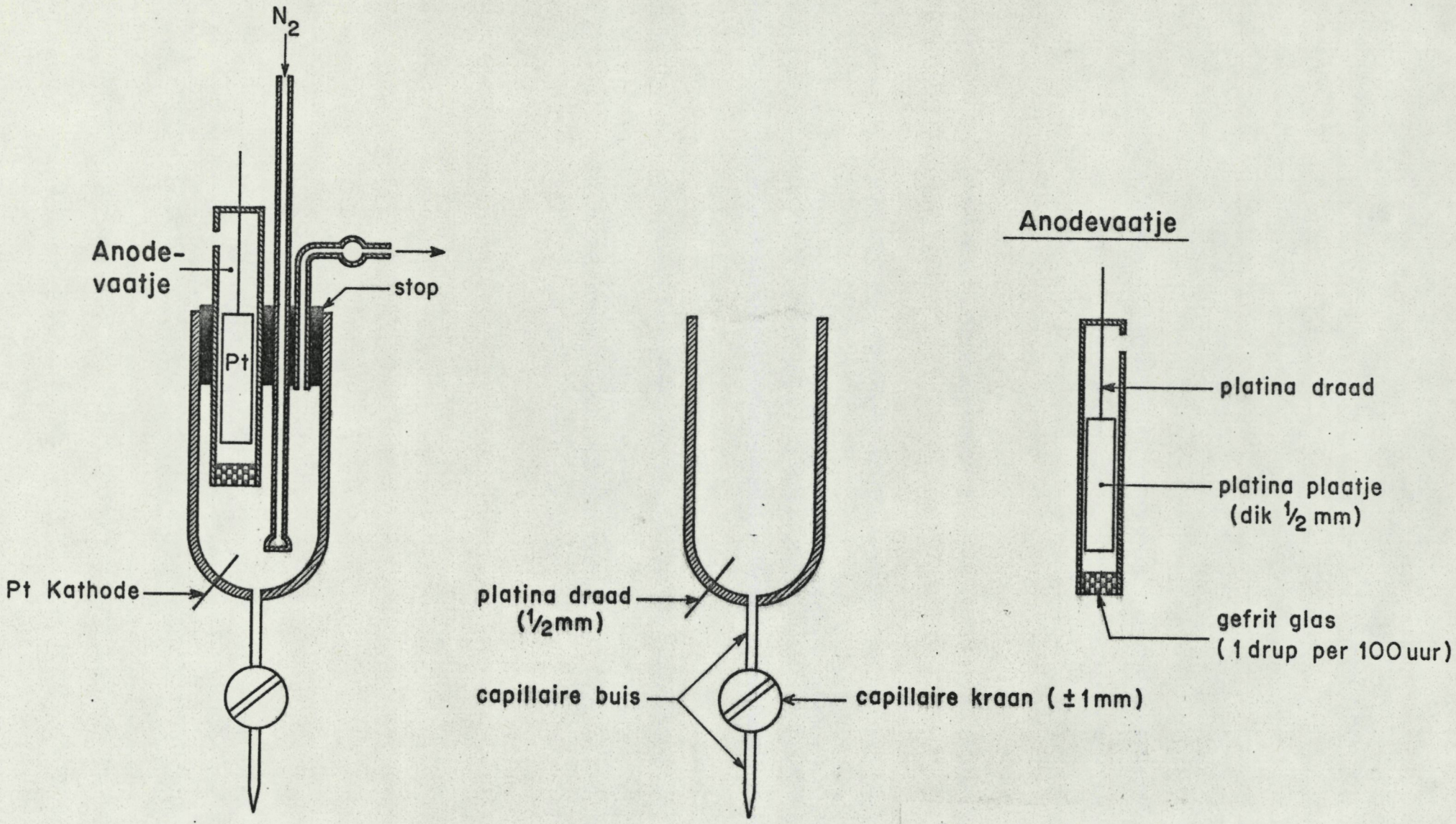


Fig. 2 : Schakelschema gebruikt bij het ijken van de INT-oplossingen. (gewijzigd naar PACKARD & HEALY 1968).



Schaal 1:1

Fig. 3. Bouw elektrolysecel

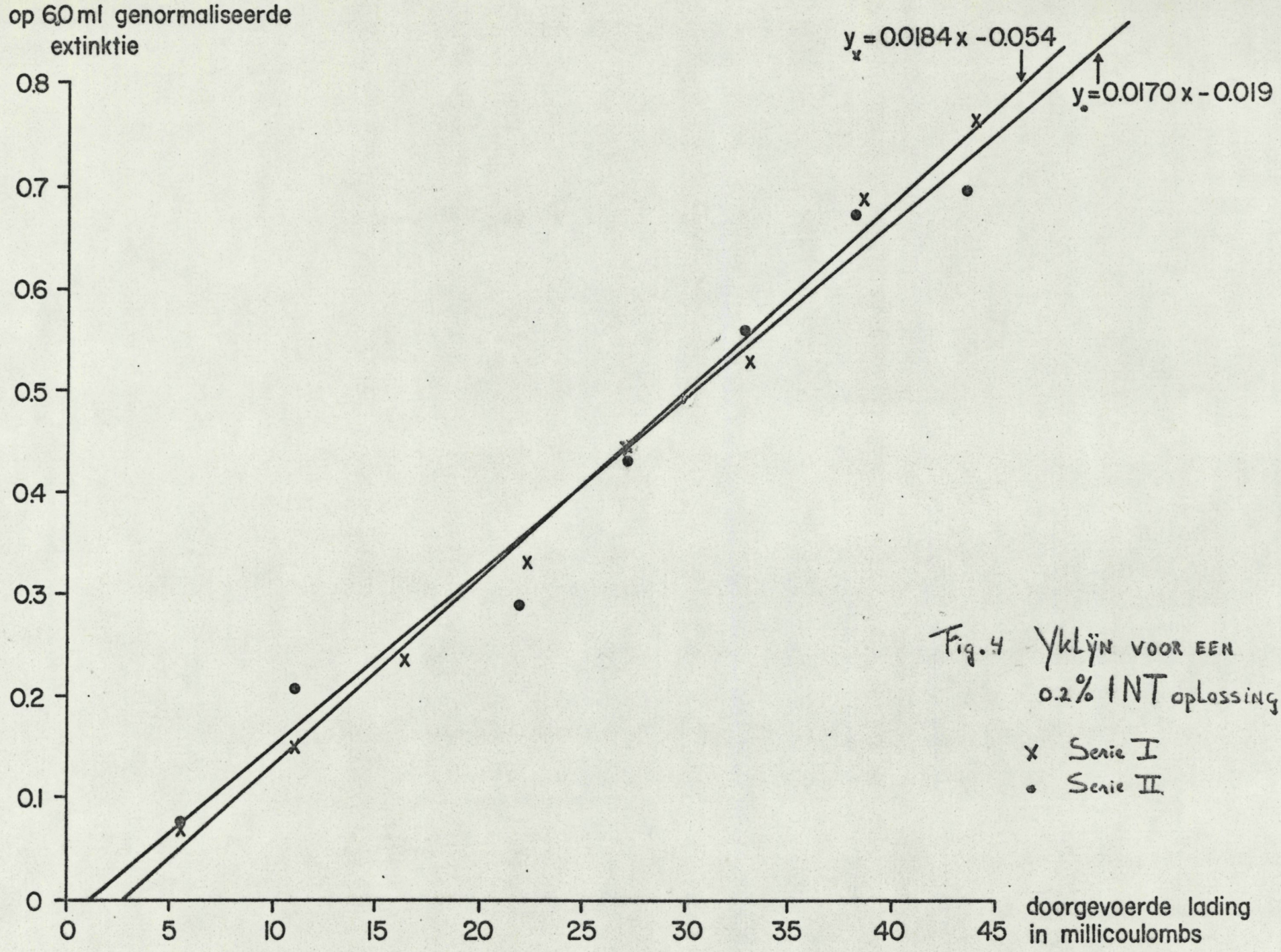


Fig. 4 Yklijn voor een 0.2% INT oplossing (A)

x Serie I

• Serie II

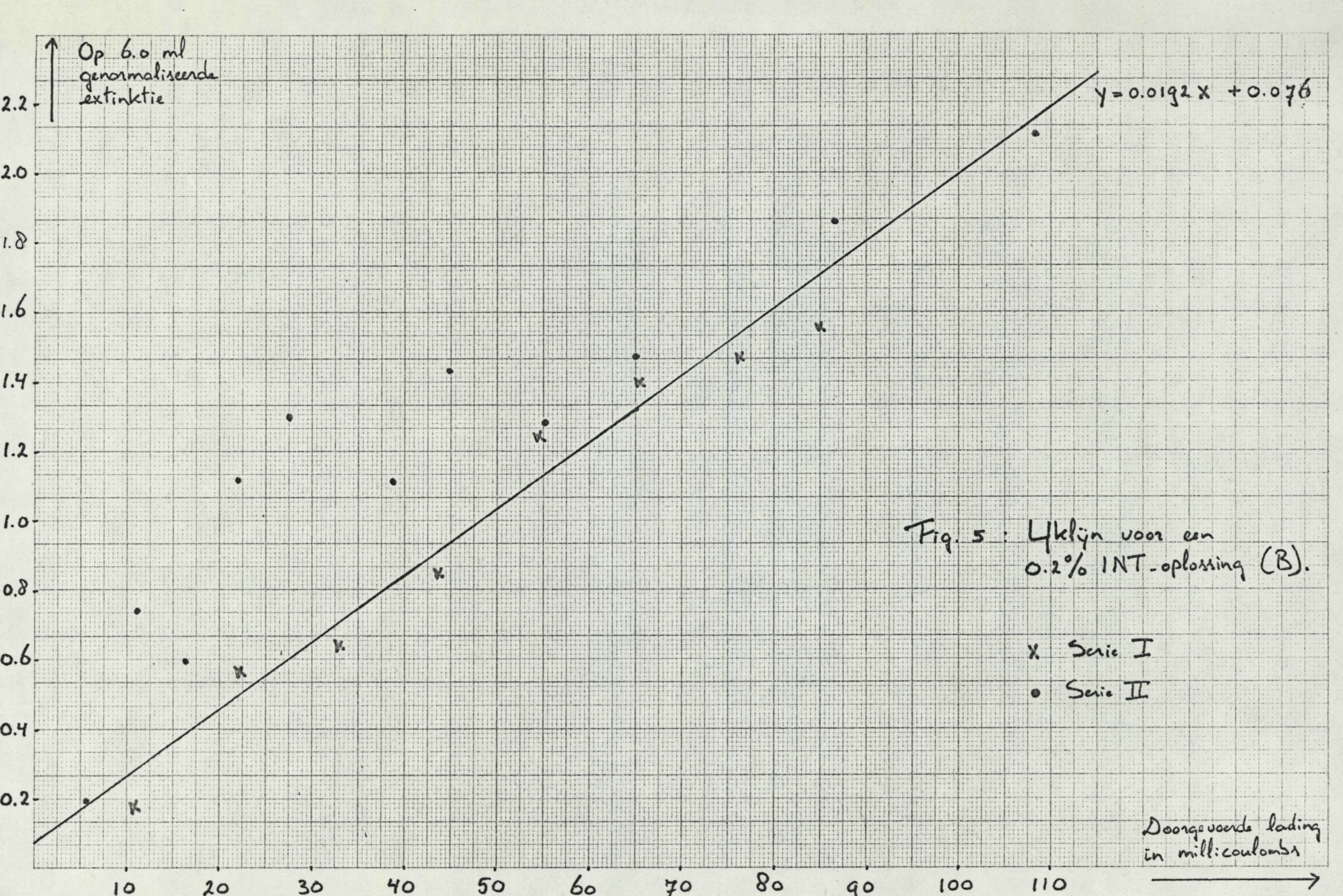


Fig. 5 : Ijklijn voor een 0.2% INT-oplossing (B).

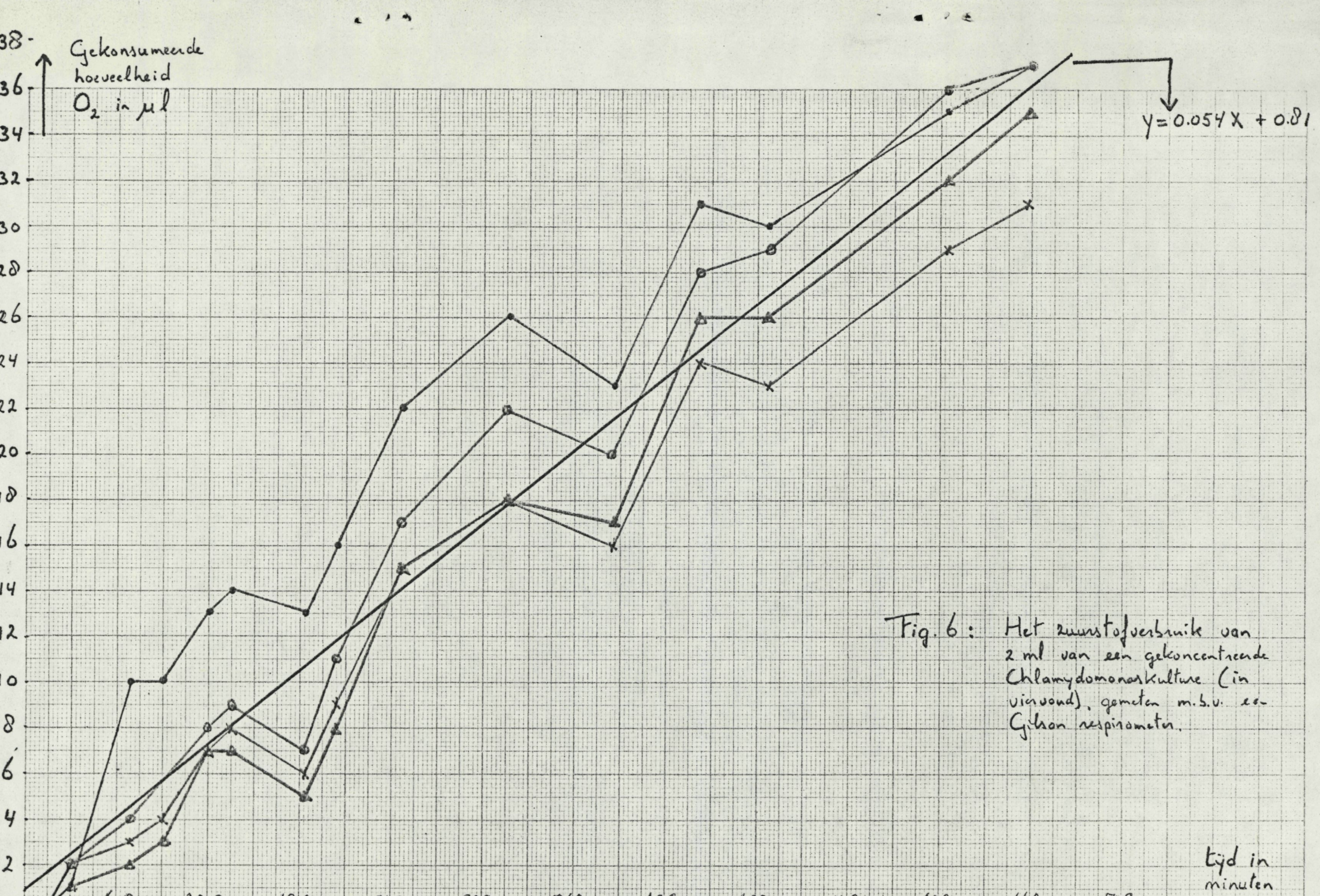


Fig. 6: Het zuurstofverbruik van 2 ml van een gekoncentreerde Chlamydomonaskulture (in viervoud), gemeten m.b.v. een Gilson respirometer.

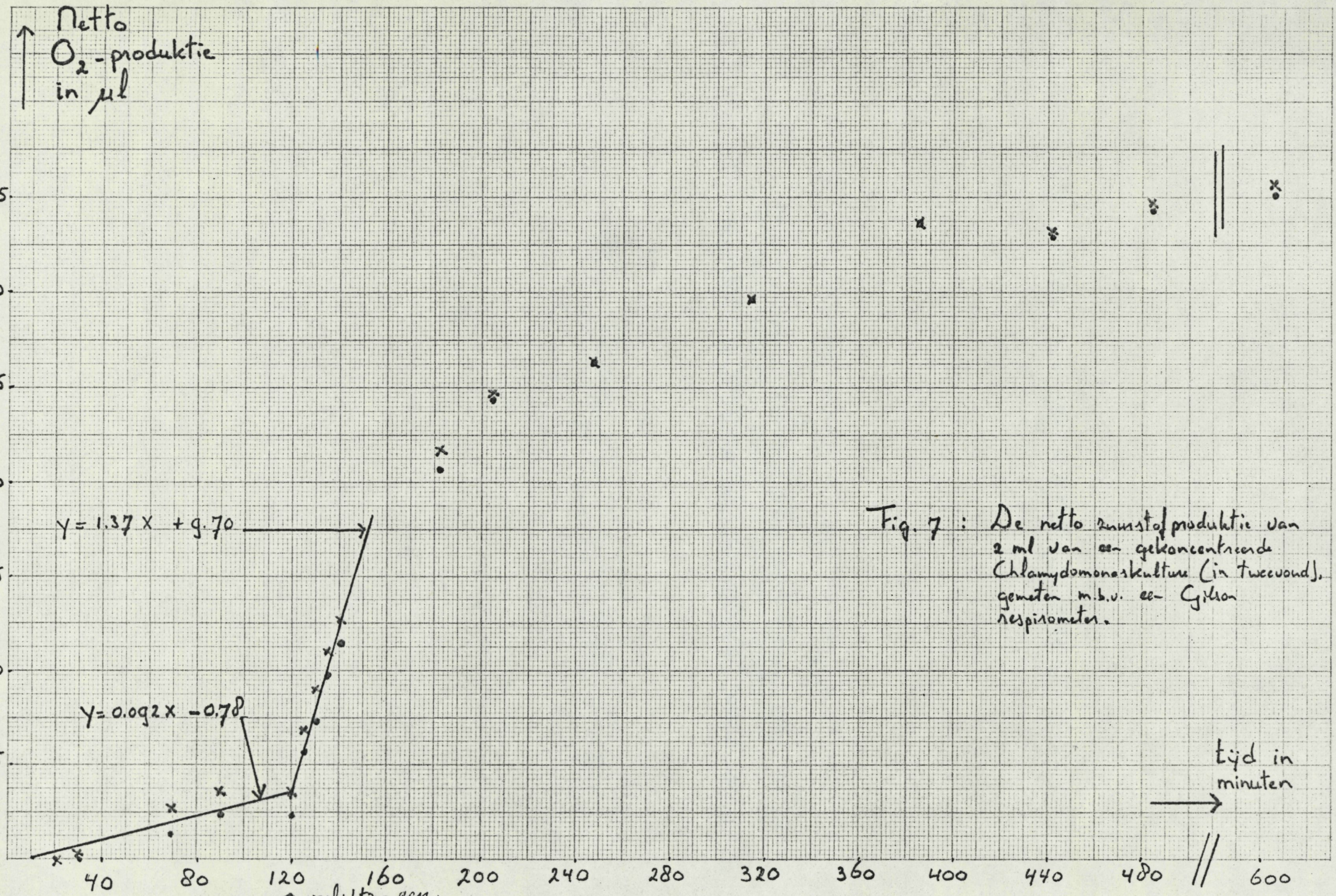


Fig. 7 : De netto zuurstofproduktie van 2 ml van een gekoncentreerde Chlamydomonaskultuur (in tweevoud), gemeten m.b.v. een Gilson respirometer.