Macro-algen
productiemeting
in de Waddenzee

door

Steven Stapel

Intern verslag

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE
VERSLAGEN

nummer 1976 - 8

1300S

MACRO-ALGEN PRODUCTIEMETING IN DE WADDENZEE

VERSLAG VAN DE WERKZAAMHEDEN VERRICHT IN HET KADER VAN DE DOCTORAALSTUDIE, GEDURENDE DE ZOMERMAANDEN VAN 1973, 1974 EN 1975 VOOR

j. ringelberg

(g.u.-a'dam)

ONDER SUPERVISIE VAN

g.c. cadée

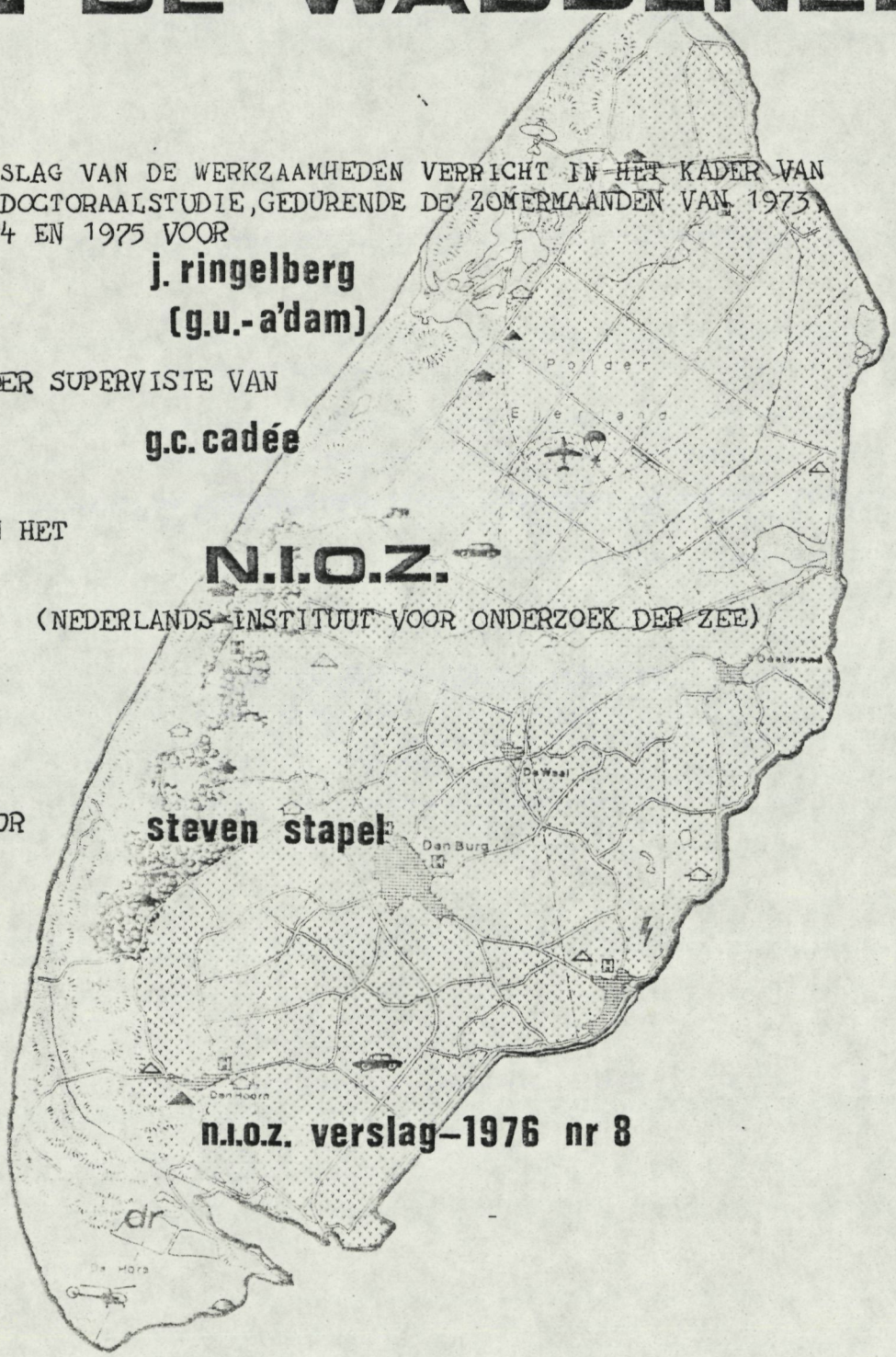
AAN HET

N.I.O.Z.

(NEDERLANDS-INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE)

DOOR

steven stapel



n.i.o.z. verslag–1976 nr 8

I N H O U D

		Blz.
	Summary	1
I.	Inleiding	2
II.	Verklaring van een aantal genoemde begrippen	3
III.	Bepaling van de hoeveelheid Ulva- en Enteromorphabiomassa in de Waddenzee	4
IV.	Bepaling van de productiviteit per gewichtseenheid alg	5
V.	De Productiemetingen	6
	V.1 De O_2-methode	7
	V.2 De hoeveelheid alg per productieflesje, incubatietijd	12
	V.3 De ^{14}C-methode	15
	V.4 De Verbrandingsmethode	19
	Handleiding voor de Verbrandingsmethode	22
	V.5 Overzicht van de productiemetingen met de ^{14}C-methode	23
VI.1.	Vergelijking van de O_2-methode (Winklertitratie) en ^{14}C-methode	24
VI.2.	Gilson Respirometer en ^{14}C-methode	26
VII.	Excretie van organisch materiaal	31
VIII.	Productie-beïnvloedende factoren	32
	VIII.1 Gasuitwisseling	32
	VIII.2 U.V.-straling	33
IX.	Conclusies	35
X.	Referenties	36
	Errata	39

SUMMARY

For the western part of the Dutch Wadden Sea primary production of phytoplankton and microphyobenthos as well as the input of organic matter from the North Sea are being investigated, but data on primary production of macrophytes are still lacking. In order to fill in this gap this study was started.

Special attention was paid to finding the best method for measuring *in situ* primary production.

The ^{14}C-method proved to be superior to the O_2-method, because of the frequent appearance of air bubbles in the oxygen bottles caused by warming up of the bottles during incubation on the tidal flat.

Dry combustion and subsequent collection of the $^{14}CO_2$ in a mixture of ethanolamine and 2-methoxyethanol gave the best results if the algae had to be prepared for liquid-scintillation-counting. This counting was carried out in a mixture of toluene (containing P.P.O. and P.O.P.O.P.) and 2-methoxyethanol and gave efficiency-values up to 80%.

Comparison of the ^{14}C-method with the O_2-method (Gilson Respirometer) gave comparable results.

Excretion of soluble organic compounds was found to be low (less than 3% of the primary production rates) to absent in all the experiments and measurements described.

I. INLEIDING

Als onderdeel van de activiteiten van de N.I.O.Z.-werkgroep "Voedselketen en Productieonderzoek" werd door Cadée en Hegeman (1974 a en b) de primaire productie van fytoplankton en micro fytobenthos gemeten.
Om tot een schatting te komen van de hoeveelheid voedsel die beschikbaar is voor de primaire consumenten in de Waddenzee, zijn tevens metingen nodig van de aanvoer van organisch materiaal vanuit Noordzee en IJsselmeer en van de productie van meercellige algen die hetzij op, en hetzij zwevend boven de wadden voorkomen. De aanvoer van allochthoon organisch materiaal werd gemeten door Postma (1954).

Omdat gebleken is dat de productiviteit van mariene macrofyten gemeenschappen zeer hoog kan zijn (Mann 1972) lijkt het niet juist deze factor buiten beschouwing te laten bij de bestudering van voedselkennis in de Waddenzee, omdat de grote hoeveelheid detritus die uit deze macro-algen ontstaat een belangrijk onderdeel van het voedsel van vele mariene everfebraten vormt (Mann 1972).

Voor de bepaling van de productiviteit van genoemde algen zijn twee gegevens nodig:

1. Hoeveel biomassa bevindt zich binnen een bepaald tijdsbestek in de Waddenzee?
2. Hoe groot is de productie aan organisch materiaal van deze hoeveelheid biomassa?

Doel van het onderzoek was om methodes te testen die antwoord op bovenstaande vragen zouden kunnen geven.

Gewerkt werd met de in de Waddenzee het meest voorkomende macro-algen Ulva en Enteromorpha.

II. VERKLARING VAN EEN AANTAL GENOEMDE BEGRIPPEN

In het navolgende deel van het verslag wordt een aantal termen gebruikt die hier omschreven worden opdat zij verder geen toelichting behoeven.

Balgzandmeting:

in de periode juli-september 1973 zijn enige productiemetingen gedaan op het Balgzand, gelegen tussen Wieringen en Den Helder. Op dit waddengedeelte stond toendertijd de N.I.O.Z.-wadtoren. Hierdoor konden productiemetingen gedaan worden van zonsopgang tot zonsondergang.

Carrousselexperiment:

productieflesjes werden vastgeklemd op een schijf die kon draaien in een waterbad dat met een termostaatregeling op de gewenste temperatuur (meestal 18°C) kon worden gehouden. Door een lichtbak met zes Philips TL 55 fluorescentiebuizen werd een constante lichtenergie van $\pm$ 0,1 g cal/cm^2 geleverd.

Gilsonexperiment:

productiemetingen werden gedaan met de Gilson Differentiële Respirometer. Gasdrukveranderingen worden, tenzij anders vermeld, uitgedrukt in µl/gewichtseenheid alg. Voor verdere beschrijving zie Hfdstuk: "Gilson Respirometer".

Jan Hegeman:

overal aanwezige steun, soms bestraffend, altijd bereidwillig.

N.I.O.Z.-wad meting:

productieflesjes werden geïncubeerd op het bij laag water droogvallende deel bij de N.I.O.Z.-haven.

III. BEPALING VAN DE HOEVEELHEID ULVA- EN ENTEROMORPHA-BIOMASSA IN DE WADDENZEE

Het vaststellen van de totale hoeveelheid biomassa wordt ernstig bemoeilijkt door de volgende omstandigheid:
In het juveniele stadium leven de door ons beschouwde soorten vastgehecht aan een substraat, b.v. een schelp op de wadbodem, een stuk hout (b.v.: N.I.O.Z.-ponton) terwijl zij later, naar alle waarschijnlijkheid door golfslag of stroming hiervan losgescheurd worden. De thallusstukken drijven vervolgens voor onbepaalde tijd rond om daarna b.v. na een relatief hoge vloed ergens te stranden (b.v. de Mokbaai en het N.I.O.Z.-wad) en te vergaan. Doordat de thallusstukken zich gedurende een groot deel van hun vegetatieperiode door stromingen laten verplaatsen, is het erg lastig vast te stellen hoeveel biomassa zich binnen een bepaald tijdbestek in een bepaald gebied bevindt. Het bepalen van het biomassaverloop in de tijd zal derhalve grote problemen geven.

Door het plaatsen van fuiken en het wegen van de daarin aangetroffen hoeveelheid macro-algenmateriaal zou misschien een beeld te vormen zijn van het jaarlijks biomassaverloop. Door ons is een andere methode geprobeerd:
D.m.v. een op het N.I.O.Z. vervaardigde constructie werd het mogelijk gemaakt om een fotocamera te bevestigen aan de zijkant van een 1-motorige Cessna van "Texel Air". Op deze wijze werd vanaf 200 m hoogte met diverse zwartwit- en kleurenfilms een stuk was gefotografeerd waarop veel algenmateriaal was gesignaleerd. Zwart-witfilms bleken niet te voldoen omdat b.v. mosselbanken van de gekozen hoogte niet te onderscheiden waren van algenmateriaal. De kleurenfilms gaven bruikbaarder resultaten.

Toen vervolgens echter bleek dat de technische en practische aspecten van de "in situ"-productie per gewichtseenheid alg moeilijkheden zouden gaan opleveren, werd besloten om het vraagstuk van de biomassabepaling voorlopig te laten liggen.

IV. BEPALING VAN DE PRODUCTIVITEIT PER GEWICHTSEENHEID ALG

Omdat het in de bedoeling ligt om op verschillende plaatsen in de Waddenzee productiemetingen te doen moest een methode gevonden worden die geschikt is voor "in situ"-metingen en derhalve niet afhankelijk is van omvangrijke apparatuur.
Het lag daarom voor de hand om gebruik te maken van de z.g. "Light- & Darkbottle"-methode (verder afgekort tot "L.B. + D.B."-methode.
Hierbij bestaan twee mogelijkheden:

1. Productiemeting op basis van de veranderde zuurstofconcentraties in L.B. en D.B., (Gaarder & Gran 1927): O_2-methode

2. Productiemeting op basis van de hoeveelheid opgenomen gelabelde kooldioxide ($^{14}CO_2$), (Steemann Nielsen 1952): ^{14}C-methode.

Deze L.B. en D.B.-methode kan worden toegepast indien gelet wordt op het volgende:

- bij relatief lange incubatie treedt bacteriegroei op die zowel O_2-methode als ^{14}C-methode stoort, en bovendien niet even groot is in L.B. en D.B., omdat bij voortdurende incubatie in de L.B. de pH stijgt (Talling 1960) terwijl in de D.B. de temperatuur stijgt (Riley 1938)
- bij langere incubatie kunnen bepaalde nutriënten opraken
- L.B.'s en D.B.'s worden naarmate de incubatie voortduurt minder vergelijkbaar wat betreft respiratie (Gessner + Panier 1958) en donker-carboxylatie (Fogg 1963).

Een voordeel van de O_2-methode is, dat uit de gemeten afname van de O_2-concentratie in de D.B. een maat voor de optredende respiratie kan worden bepaald. Dit is bij de ^{14}C-methode niet mogelijk. Daarom werd eerst de O_2-methode getest op zijn toepasbaarheid voor "in situ"-metingen in de Waddenzee.

V. DE PRODUCTIEMETINGEN

De bij de productiemetingen gebruikte thallusdelen waren afkomstig van de macro-algen Ulva en Enteromorpha, vertegenwoordigers der Chlorophyta, behorende tot de order der Ulvales. Zij worden gekenmerkt door een parenchymatisch thallus, één of twee cellagen dik, dat geen verdere differentiatie vertoont, zodat b.v. speciaal transportweefsel ontbreekt.
Ulvasoorten hebben een bladachtig, Enteromorphasoorten een buisvormig gekronkeld thallus (zie ook: Coesel 1969).
Door bovenstaande eigenschappen kan naar alle waarschijnlijkheid zonder veel bezwaar voor productiemeting een thallusfragment van een groter geheel afgescheurd worden.

Bij alle productiemetingen werd het algenmateriaal geïncubeerd met zeewater afkomstig van de plaats van productiemeting zelf, dit om zoveel mogelijk de natuurlijke omstandigheden te handhaven. Vóór de incubatie werd zeewater gefiltreerd door een Sartorius Membraan filter (S.M.11306, porc 0.45 µm).

De opgegeven waarden voor de lichtenergie (in g cal/cm^2) geven de lichtenergie die het wad met de daarop liggende productieflesjes ontvangt. Deze waarden zullen dus sterk afhankelijk zijn van waterhoogte en troebelheid en worden berekend m.b.v. Secchischijf- en solarimeterwaarden. (zie: Cadée + Hageman 1974 b).

Productiewaarden worden uitgedrukt in hetzij µgat O/mg alg;
µg C/mg alg;
µl O_2/mg alg;
Gewichten (in mg) werden bepaald na minimaal drie dagen bij 65°C (in stoof). Langer drogen gaf geen relevante verdere gewichtsafname.

Alle gemiddelden worden gegeven ± 2 S.

V 1. DE O_2-METHODE

Door fotolyse van H_2O ontstaat in de L.B. zuurstof, terwijl in de D.B. door respiratie O_2 wordt weggenomen.
De optredende toe- en afname van opgeloste zuurstof wordt gerelateerd aan de aanvangszuurstofconcentratie van het voor de incubaties gebruikte zeewater. Bepaling der zuurstofconcentraties geschiedt met de WINKLER-titratie zoals beschreven in Strickland + Parsons (1968).

Na de incubatie werd de stop van het "productie-" of "respiratie"-flesje genomen, $MnCl_2$ en NaOH/JKJ werden toegevoegd, waarna een bruinachtig neerslag ontstond dat het in het flesje aanwezig algfragment volledig bedekte. Na aanzuren met 2 ml 10 N H_2SO_4 ontstond een heldere vloeistof; daarna werd het stukje alg m.b.v. een pincet uit het flesje genomen, afgespoeld en opgeborgen in aluminiumfolie, zodat later het gewicht bepaald kon worden.

Van de heldere vloeistof werd twee maal een monster van 25 ml getitreerd.

Het aantal µgat O/flesje wordt gegeven door:

$$\text{aantal ml thio} \times \text{titer} \times \frac{1000}{2} \times \frac{1000}{V-3} \times \frac{V}{25} \times \frac{V}{1000}$$

$$= \text{aantal ml thio} \times \text{titer} \times 20 \frac{V^2}{V-3}$$

vóór de incubatie begon was het aantal µgat O/flesje:

$$\frac{V \text{ incubatieflesje}}{V \text{ "aanvangswaarde-flesje"}} \times \text{aantal µgat O in "aanvangswaarde-flesje"}$$

Nettoproductie (per mg alg) wordt weergegeven door de zuurstoftoename in µgat O/mg alg in de L.B.; respiratie door de afname van zuurstof in µgat O/mg alg in de D.B.
Brutoproductie wordt gegeven door de som van beide waarden.

Volgens de beschreven methode werden twee dagproducties gemeten op het Balgzand, op 19-7-1973 en 9-8-1973.

19-7-1973:

Met laag water werden thallusstukken van Ulva en Enteromorpha verzameld, hiervan werden fragmenten afgescheurd ter incubatie. I.v.m. de op blz.5 genoemde potentiële storingen en afwijkingen werd de dagproductie bepaald uit de som van de productiewaarden van twee halvedagseries.

De eerste serie werd buitengelegd van 4.30 u tot 12.40 u. Naderhand bleek dat alle L.B.'s van Ulva en Enteromorpha minder zuurstof bevatten dan bij de aanvang van de incubatie. Een mogelijke verklaring hiervoor is, dat vrij rondzwevende macro-algen zich om de flesjes gelegd hadden waardoor een zodanige verduistering ontstond dat geen fotosynthese kon plaatsvinden, of dat in elk geval de respiratie de overhand had. Omdat dit vaker gebeurde werden de productieflesjes op het Balgzand altijd binnen een "kooi" van kippengaas gelegd.

De waarden van de eerste serie werden daarom als niet representatief beschouwd.

De middagserie leverde de volgende waarden op:

Tabel 1: L.B. en D.B.waarden van Ulva en Enteromorpha op het Balgzand op 19-7-1973; incubatie van 12.40 u - 20.30 u.

		lichtenergie: 15.3 g cal/cm^2	
	gew.in mg	zuurstoftoename in µgat O/mg alg	
L.B. Ulva	28,6	1,57	
L.B. Ulva	42,0	1,45	
L.B. Ulva	4,4	1,80	1,64 ± 0,15
L.B. Ulva	22,7	1,74	
D.B. Ulva	10,8	-0,45	
L.B. Enteromorpha	39,3	5,61	
L.B. Enteromorpha	10,96	4,81	5,04 ± 0,28
L.B. Enteromorpha	7,31	4,71	
D.B. Enteromorpha	18,60	-1,61	

Op 9-8-1973 werd opnieuw een Balgzand-productiemeting gedaan waarbij voor Ulva en Enteromorpha halve-dagseries werden geincubeerd.
De resultaten worden weergegeven door tabel 2.

Tabel 2: L.B.- en D.B.waarden Enteromorpha en Ulva op het Balgzand, 9-8-1973

1e serie: 5 u - 12.40 u alg	gew.in mg	lichtenergie 114,9 g cal/cm^2 zuurstoftoename in µgat O/mg alg	
L.B. Ulva	29,70	4,52	
L.B. Ulva	11,87	0,65	
L.B. Ulva	24,00	6,97	5,11 ± 3,04
L.B. Ulva	13,31	7,18	
D.B. Ulva	15,21	-0,28	
L.B. Enteromorpha	45,86	4,17	
L.B. Enteromorpha	48	4,07	
L.B. Enteromorpha	19,39	15,25	7,57 ± 5.41
L.B. Enteromorpha	22,51	5,24	
D.B. Enteromorpha	10,34	-0,39	
2e serie: 12.40 u-20.30 u.		**lichtenergie 18,7 g cal/cm^2**	
L.B. Ulva	12,96	1,95	
L.B. Ulva	13,49	3,25	
D.B. Ulva	6,75	-0,36	
L.B. Enteromorpha	26,10	1,98	
L.B. Enteromorpha	14,33	2,41	
L.B. Enteromorpha	9,06	2,76	2,54 ± 1,41
D.B. Enteromorpha	2,46	3,01	

De D.B. voor Enteromorpha bevatte gasbellen.

Bij de gevolgde Winkler-procedure viel het volgende op:
Na toevoeging van 2 ml 10 n H_2SO_4 onderging het algenmateriaal in het te titreren flesje een sterke kleurverandering, waarschijnlijk door de snelle afbraak van chlorofyl. Het is niet onaannemelijk dat door de zeer plotselinge verandering van het milieu de alg door osmotische krachten kapot gaat, waarbij organische stoffen vrijkomen die de Winkler-titratie kunnen storen (Theriault + McNamee 1932).

Om te onderzoeken of een dergelijk effect inderdaad optreedt werd het volgende gedaan:

10 uitgeponste stukjes Ulva (opp. 0,785 cm^2) werden gedurende 1 uur bewaard in zeewater;
10 identieke stukjes gedurende 1 uur in zeewater + $MnCl_2$/NaOH/JKJ;
10 stukjes gedurende 1 uur in zeewater + $MnCl_2$ NaOH/JKJ + 2 ml 10 n H_2SO_4.

Na incubatie werden de drie series drie dagen gedroogd bij 65°C en gewogen. Het resultaat wordt weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 3: Effect van de Winklertitratiechemicaliën op het gewicht van uitgeponste Ulva-schijfjes na 1 uur incubatie

Incubatiemedium	gewicht in mg
zeewater	5,61 ± 0,23
zeewater + $MnCl_2$,NaOH/JKJ	4,83 ± 0,33
zeewater + $MnCl_2$,NaOH/JKJ+H_2SO_4	4,38 ± 0,31

Deze tabel maakt aannemelijk dat door de chemicaliën van de Winklertitratie gewichtsafname optreedt waarbij organisch materiaal in het te analyseren milieu terecht komt.

Gekeken werd daarom, wat de verandering in zuurstofconcentratie zou kunnen worden indien het algfragment m.b.v. een pincet uit het flesje wordt gehaald vóórdat de chemicaliën toegevoegd worden.

Vijf productieflesjes werden gevuld met zeewater en geanalyseerd op zuurstofgehalte, terwijl bij vijf andere flesjes, met hetzelfde zeewater gevuld, voorafgaand aan de titratie het water met een pincet geroerd werd.
Ditzelfde werd gedaan met zeewater dat door langdurig vacuümpompen O_2-onderverzadigd was.

Het resultaat was het volgende:

Tabel 4. Effect van "roeren" op de O_2-concentratie (in µgat O/l) in productieflesjes

	ongeroerd	geroerd
zeewater	563,92 ± 0,98	560,65 ± 3,66
zeewater na vacuümpompen	235,74 ± 0,99	248,91 ± 4,18

Uit deze tabel blijkt, dat indien het algenfragment vóór de Winklertitratie uit het flesje wordt genomen, waarbij een gering "roereffect" optreedt, de grootst mogelijke afwijking in de zuurstofconcentratie ± 7% bedraagt. Bij verdere productie-experimenten werd dit dan ook gedaan.

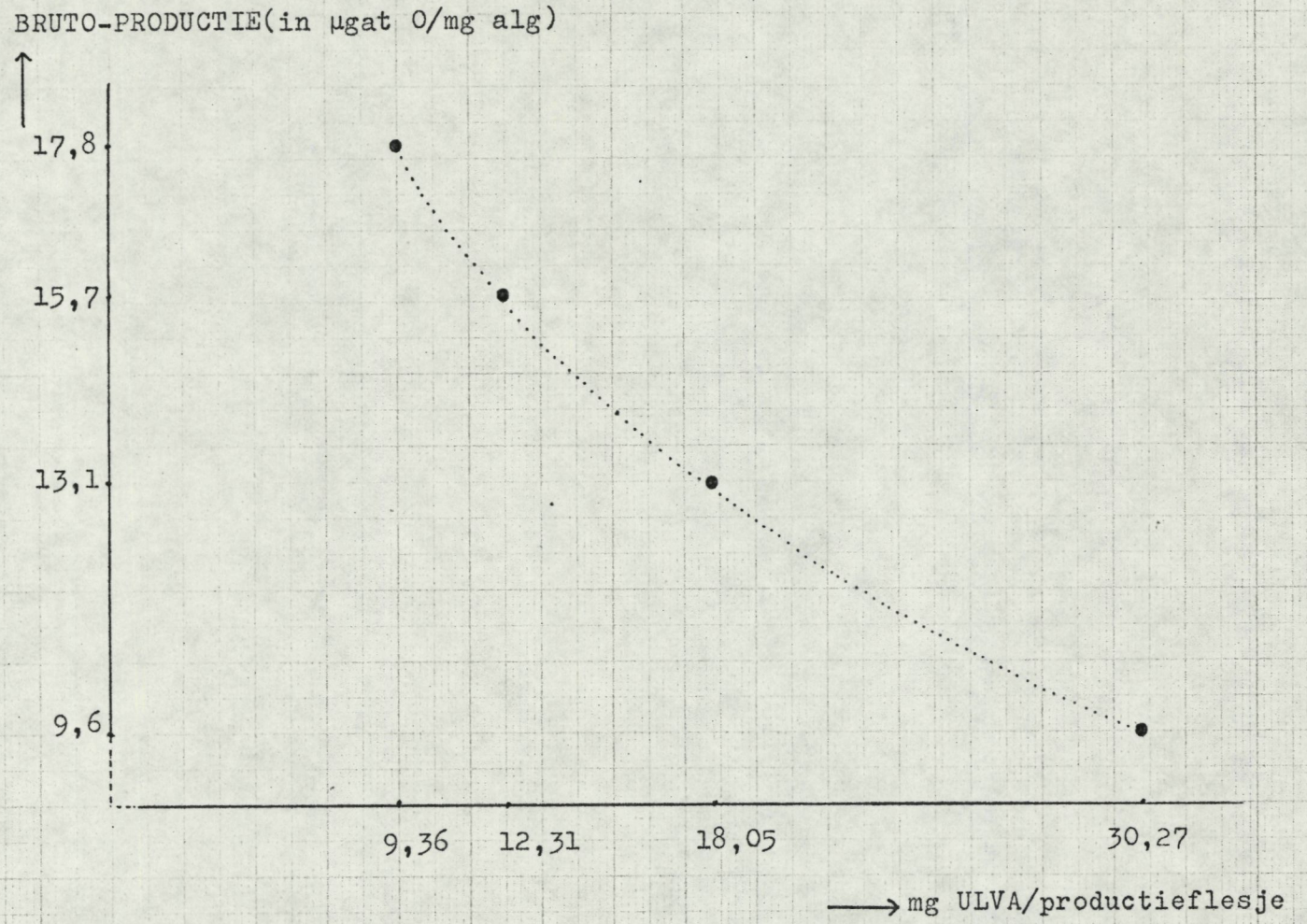


FIG.1:Verband tussen BRUTOPRODUCTIE(in µgat O/mg ULVA) en de geïncubeerde hoeveelheid ULVA(in mg)

V 2. DE HOEVEELHEID ALG PER PRODUCTIEFLESJE; INCUBATIETIJD

De productiewaarden, uitgedrukt in ugat O/mg alg, van 19-7 en 9-8 deden het vermoeden rijzen dat er een correllatie bestaat tussen de hoeveelheid algenmateriaal die ter productiebepaling in een 100 ml productieflesje gebracht wordt en de gevonden productiewaarden per gewichtseenheid alg. Voorstelbaar is, dat bij incubatie van grotere hoeveelheden alg gebrek aan bepaalde essentiële nutriënten gaat optreden, met als gevolg: een lagere productie. Om deze veronderstelling te toetsen werd een 16-uur durend experiment gedaan waarbij 6 flesjes, vier L.B.'s en twee D.B.'s, in de carroussel werden gebracht.
Uit de gevonden waarden voor de brutoproductie/mg alg, zoals weergegeven in fig.1, blijkt dat het raadzaam is om productiemetingen te doen met relatief kleine hoeveelheden algenmateriaal. Daarom werden alle verdere experimenten gedaan met eerder genoemde uitgeponste Ulva-schijfjes, die een handzaam proefobject vormden.

De respiratiewaarden in de D.B.'s van voornoemd experiment bedroegen 0,91 ugat O/mg alg en 0,86 ugat O/mg alg.
Dit was dus minder dan 10% van de nettoproductiewaarden. Dit duidt erop dat ook bij een dermate langlopend experiment geen bacteriegroei van importantie was opgetreden.

Met de Ulva-schijfjes werden twee carrousselexperimenten gedaan:

Exp.1: drie schijfjes werden gedurende twee uur (serie 1) en drie schijfjes gedurende vier uur (serie 2) in de carroussel gebracht. Respiratie werd niet bepaald. Na incubatue werden nettoproductie/mg alg.uur en nettoproductie/µgram chlorofyl.uur bepaald, zie tabel 5.

Tabel 5.

	nettoprod/mg alg.uur	nettoprod/µgram chlorofyl.uur
serie 1	o,92 ± 0,42	0,223 ± 0,08
serie 2	0,86 ± 0,07	0,237 ± 0,04

De chlorofylbepalingen werden gedaan volgens de methode van Lorenzen (1967), nadat de alg m.b.v. een vijzel en mortier was gehomogeniseerd.

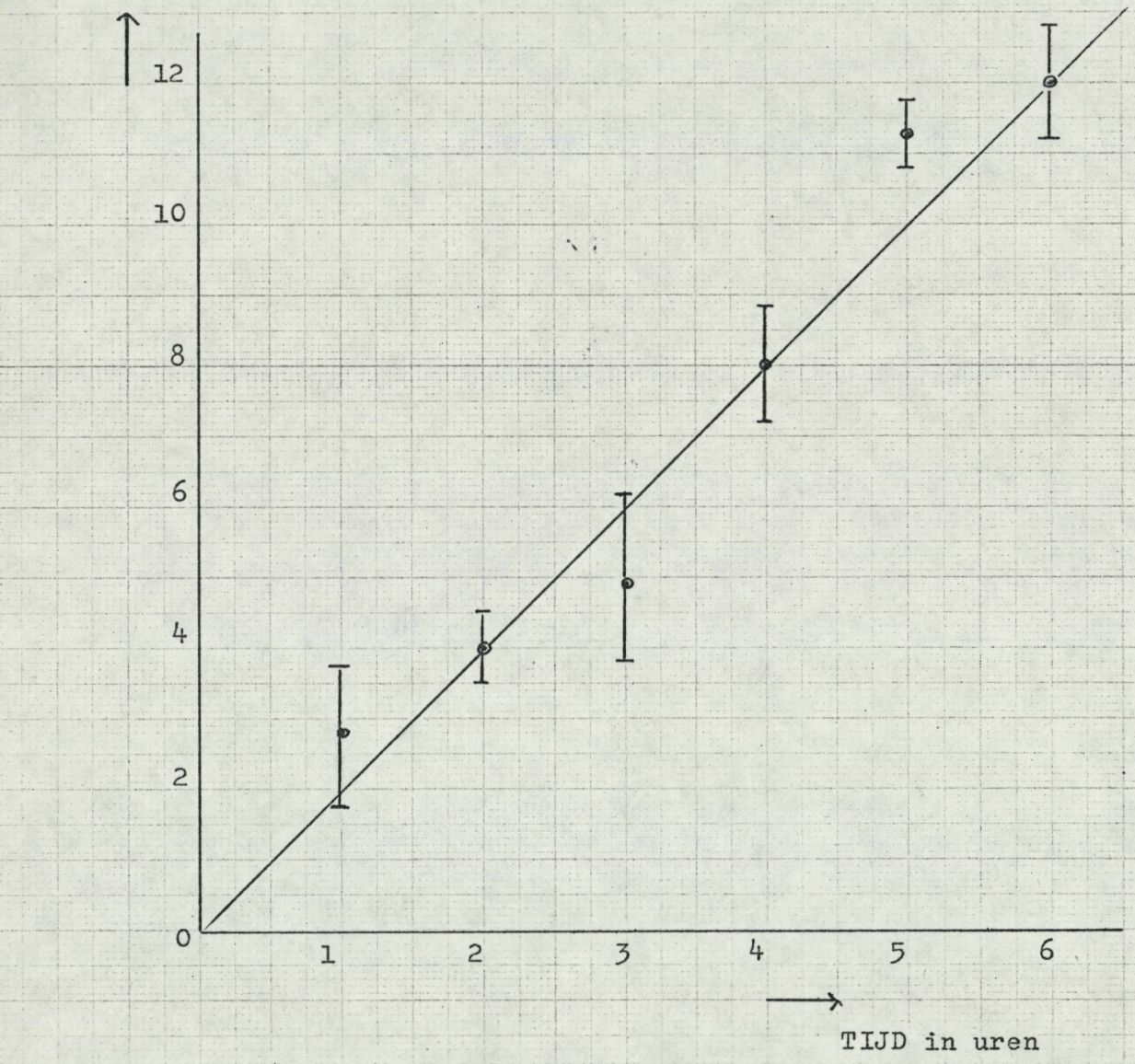


FIG.2:NETTO-PRODUCTIE(in µgat O/mg alg) van ULVA als functie van de tijd.

Omdat uit het boven besproken experiment een mogelijk lineair verband tussen nettoproductie en incubatietijd bleek, werd het volgende gedaan:

Exp.2: 12 flesjes met Ulva-schijfjes werden in de carroussel gebracht, met intervallen van één uur werden twee flesjes uitgenomen en de nettoproductie bepaald. De gemiddelde waarden van deze paren werden uitgezet tegen de tijd. Het resultaat wordt weergegeven in fig.2.

Hieruit blijkt dat bij een zes uur durende incubatie met Ulva-schijfjes weinig kans is op een afname van de nettoproductie/mg alg. Uit figuren 1 en 2 mag geconcludeerd worden dat productiemetingen van een dergelijke tijdsduur met Ulva-schijfjes veilig gedaan kunnen worden, indien geïncubeerd wordt in 100 ml zeewater.

Daarom werd op 30-8-1973 op het Balgzand nogmaals een productiemeting gedaan, waarbij de dag in 3 series werd verdeeld.

Tabel 6. Productie- en respiratiewaarden van Ulva-thallusschijfjes op het Balgzand, 30-8-1973

serie	periode	lichtenergie	toename O_2 in µgat/mg alg
1	6.00 u - 11.00 u	6,8	L.B.'s: 0,90 ± 0,2
			D.B. : -1,00
2	11.00 u - 15.00 u	16,6	L.B.'s: 2,68 ± 1,32
			D.B. : -0,68
3	15.00 u - 19.30 u	44,1	L.B.'s: 1,47 ± 0,46
			D.B. : -0,29

Tijdens deze productiedag bleek dat in twee L.B.'s van serie 1 en in één L.B. van serie 3 gedurende de incubatie gasbellen waren ontstaan, mogelijk door intensieve fotosynthetische activiteit.
Indien het hier om zuurstofbellen gaat, dan onttrekt een gedeelte van de geproduceerde zuurstof zich aan de bepaling omdat bij het openen van het flesje deze zuurstof verdwijnt, terwijl met de Winklertitratie alleen opgeloste zuurstof bepaald kan worden. Toen een flesje, slechts gevuld met zeewater, buiten in het

volle zonlicht werd gezet, ontstond door opwarming reeds belvorming!
Dit betekent dat de O_2-methode met de Winklertitratie tè riskant is om productiemetingen te doen in een gebied waar de incubatieflesjes bij laag water door de zon opgewarmd kunnen worden.

Voor het uitvoeren van carroussel-experimenten bleek de methode wel degelijk bruikbaar.

V 3. DE ^{14}C-METHODE

Toen aan de O_2-methode belangrijke bezwaren verbonden bleken te zijn, moest voor "in situ"-productiemetingen overgestapt worden op de ^{14}C-methode die in feite gevoeliger is, maar als nadeel heeft dat geen respiratie bepaald kan worden. In de D.B. wordt gemeten hoeveel koolstof gefixeerd wordt anders dan door fotosynthese (Fogg 1963).
De verkregen waarden zullen tussen de waarden voor netto- en brutoproductie inliggen (Steemann Nielsen, 1964 a) omdat naarmate de incubatie voortgaat er ook gelabelde verbindingen worden verademd waardoor in de cel $^{14}CO_2$ vrijkomt dat opnieuw kan worden vastgelegd.
Brutoproductie zou worden gemeten als in het geheel geen, na respiratie van gelabeld substraat vrijgekomen $^{14}CO_2$ opnieuw fotosynthetisch zou worden vastgelegd.
Nettoproductie zou worden gemeten als al dit secundair beschikbare $^{14}CO_2$ opnieuw zou worden vastgelegd.

Na incubatie met ^{14}C moet d.m.v. vloeistofscintillatie-telling vastgesteld worden hoeveel ^{14}C vastgelegd is; hieruit kan berekend worden hoeveel koolstof in totaal gebonden werd. Algfragmenten kunnen niet in intacte vorm geteld worden, zij moeten omgezet worden in een voor vloeistofscintillatie-telling geschikte vorm die zo weinig mogelijk "doving" geeft. Hiervoor zijn verschillende mogelijkheden.
De volgende mechanische en chemische methodes werden beproefd:

- sonificatie
- hoogfrequent schudden met glasparels ("Braun Zellhomogenisator")
- behandeling met KOH, methanol en 30% H_2O_2 (zie: Towle + Pearse 1973)
- behandeling met HNO_3
- behandeling met $KMnO_4$

Het bleek met géén van deze behandelingen mogelijk om Ulvamateriaal klein te krijgen!

De mortier en vijzelprocedure die gebruikt werd voor de chlorofylbepalingen zou misschien geschikt zijn, ware het niet dat er een grote kans op besmetting met radioactief materiaal aan verbonden is.
De enige methode die een redelijk resultaat zou geven was de z.g. "Potterbuismethode". Hierbij draait een exact op maat geslepen glazen stamper met grote snelheid in een glazen potterbuis. Met dit apparaat bleek een Ulva-schijfje, in aanwezigheid van een klein beetje aceton en wat 2-methoxyethanol, tot een homogene suspensie vermalen te kunnen worden. Zo ontstond de "Potterbuismethode":

1. ^{14}C-houdend Ulva-schijfje werd "gepotterd" met zeer weinig 90% aceton en 2-methoxyethanol
2. Stamper en potterbuis werden nagespoeld met methoxyethanol, de op deze wijze ontstane Ulva-suspensie werd opgevangen in een gecalibreerde centrifugebuis waarmee na het spoelen het uiteindelijke volume bepaald kon worden.
3. 200 µl van deze suspensie werd geteld in 10 cc 2-methoxyethanol/Tolueen (0,5% P.P.O; 0,05% P.O.P.O.P.)-mengsel met de Nuclear Chicago-Mark I Liquid-Scintillation Counter. (kanaalversterking D 900).

Om, uitgaande van de door de scintillatieteller gegeven kanaalverhouding B/A de efficiëncy van de telling te bepalen, werd een dovingsserie gemaakt:

Ulva-materiaal werd op boven beschreven wijze gepotterd tot een Ulva-suspensie in methoxyethanol ontstaan was; hierna werden oplopende hoeveelheden van deze suspensie, die een bepaalde doving zal veroorzaken, toegevoegd aan telpotjes met eerder genoemd telmengsel. Tevens werd aan elk der potjes dezelfde hoeveelheid ^{14}C-sucrose toegevoegd, waardoor elk potje in principe 27318 dpm bevatte.
Na scintillatietelling werd het volgende gevonden:

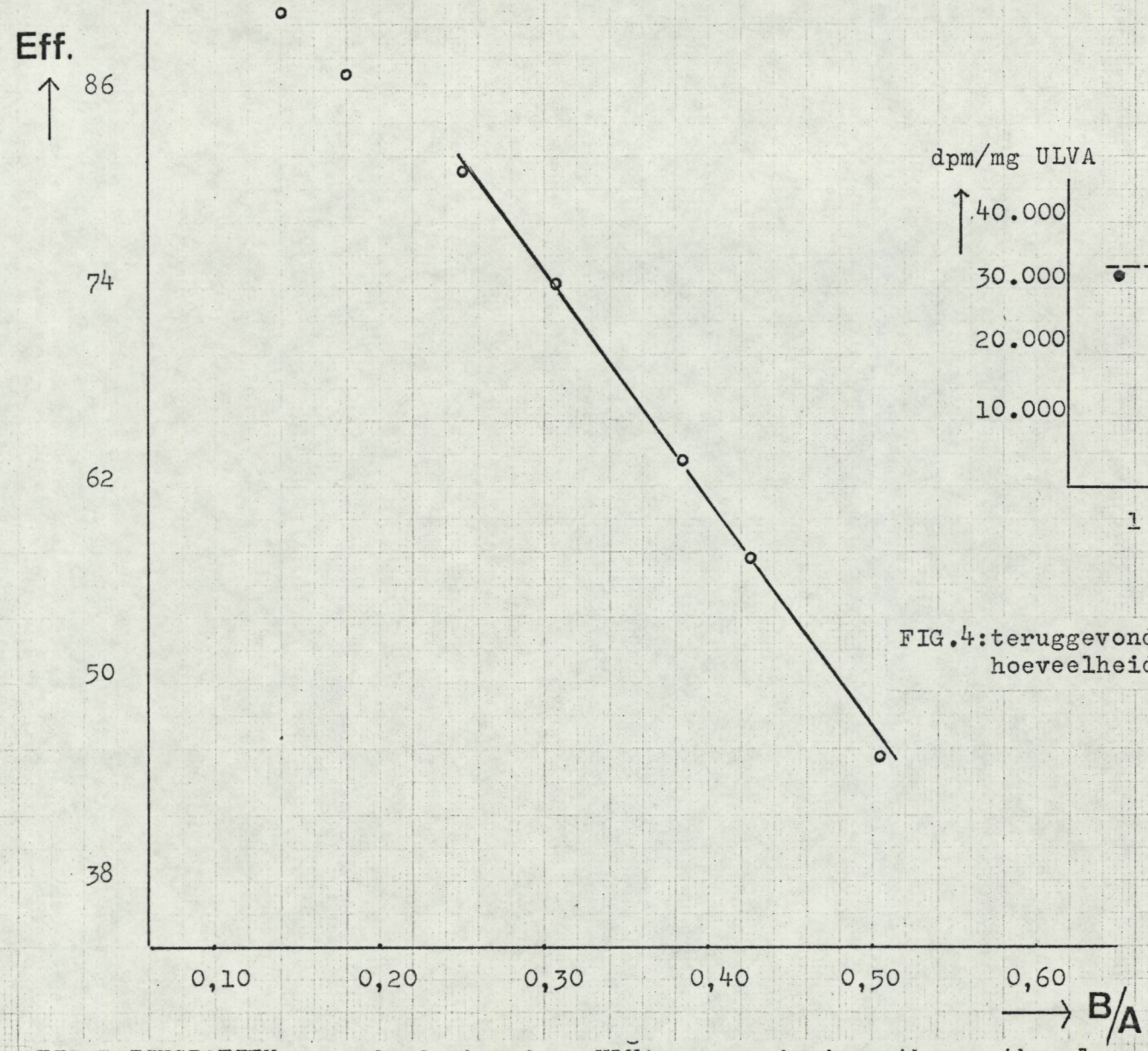


FIG.3: IJKGRAFIEK voor de doving door ULVA-suspensie in methoxy-ethanol

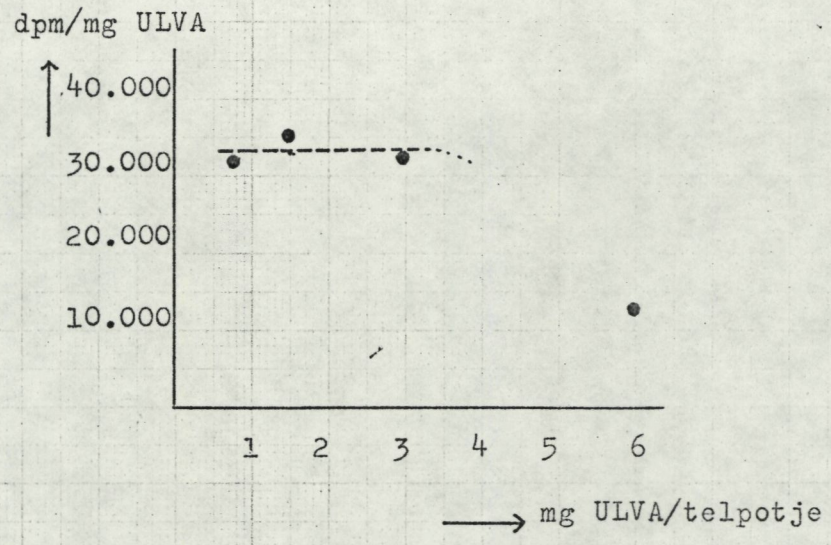


FIG.4: teruggevonden activiteit/mg alg bij oplopende hoeveelheid alg per telflesje.

Tabel 7. Doving door Ulvasuspensie

In elk telflesje: 27318 dpm

potje	cpm	B/A	berekende efficiëncy in %
1	24873	0,1369	91,05
2	23733	0,1809	86,9
3	22188	0,2570	81,2
4	20298	0,3062	74,3
5	17604	0,3837	64,4
6	10219	0,5485	37,4
7	15760	0,4362	57,5
8	14367	0,4725	52,7
9	12480	0,5136	45,7

Als de efficiëncy grafisch tegen B/A wordt uitgezet vinden we de vereiste rechte binnen het interval begrensd door de B/A = 0,24 en B/A = 0,52 (zie fig.3).

Daarom werd een controle-experiment gedaan waarbij een stuk Ulva-thallus gedurende drie dagen met ^{14}C werd geïncubeerd (5 uCi in 50 ml zeewater); hierna werd het fragment gedroogd, gewogen en "gepotterd". Zo ontstond een suspensie van 130 mg Ulva in 8,7 ml methoxyethanol. Aan zeven telpotjes met telmengsel werden verschillende hoeveelheden suspensie toegevoegd. Dit leverde de volgende waarden op:

Tabel 8. Telefficiëncy bij oplopende dichtheden van Ulvasuspensie

potje	µl Ulvasuspensie	mg Ulva	cpm	B/A	eff.
1	50	0,747	17760	0,3155	73
2	100	1,494	33389	0,3977	62,5
3	200	2,988	39116	0,5323	41
4	400	5,976	31640	0,5649	39,6
5	1000	14,940	1781	0,3694	-
6	2000	29,880	185	0,4378	-
7	4000	59,760	2571	0,3959	-

De laatste drie waarden zijn niet zinvol, omdat deze zouden impliceren dat voor één B/A-waarde twéé efficiëncywaarden zouden bestaan. Als nu met de in tabel 8 gegeven efficiëncywaarden cpm

wordt omgerekend naar dpm, wordt, door vervolgens dpm/mg Ulva uit te zetten tegen mg Ulva/telpotje, fig.4 verkregen.

Hieruit kan worden afgeleid dat een scintillatiepotje niet meer dan 2 à 3 mg algenmateriaal mag bevatten, dit omdat bij grotere hoeveelheden geen constant getal voor de verhouding dpm/mg Ulva wordt gevonden.
Daarom werd bij de ^{14}C-metingen met de potterbuismethode nooit meer dan 0,5 mg algenmateriaal geteld, terwijl de kanaalverhouding B/A steeds binnen het veilig interval o,24 - 0,52 lag.

V 4. DE VERBRANDINGSMETHODE

Een nadeel van de "Potterbuismethode" was, dat het vaak toch veel moeite kostte om het thallusschijfje te homogeniseren, terwijl bij deze pogingen soms het schijfje tussen glaswand en stamper vast bleef zitten, waarbij de zeer snel draaiende stamper vast kon lopen.
Op deze manier sprong twee maal een potterbuis tijdens de alghomogenisatie aan stukken, waarbij de scherven en de radioactieve suspensie in het rond vlogen. Besloten werd daarom deze methode, die in principe wel bruikbaar was, te verlaten en andere mogelijkheden te zoeken.

Een mogelijkheid zou kunnen liggen in de verbranding van ^{14}C-gelabeld organisch materiaal tot $^{14}CO_2$ dat opgevangen wordt in een CO_2-absorbens. Als voordeel van een dergelijke procedure wordt vooral de hoge efficiëncy bij scintillatietelling vermeld (zie b.v. Gupta, 1966).

Om deze methode te kunnen gebruiken werd gebruik gemaakt van de op het N.I.O.Z. aanwezige "Coleman C + H-Analyser". In dit apparaat worden koolstof en waterstofhoudende monsters onder O_2-toevoer verbrand, waarna de ontstane CO_2 en H_2O met de gasstroom mee worden gevoerd en opgevangen worden in de z.g. CO_2- en H_2O absorptiebuizen. Gewichtstoename van deze buizen is een maat voor de in het verbrande monster aanwezige hoeveelheden aan koolstof en waterstof.
Doordat deze verbranding plaats vindt bij $\pm$ 750°C mag aangenomen worden dat ook algenmateriaal volledig verbrandt.
De CO_2- en H_2O absorptiebuizen werden vervangen door lege buizen, zodat de gasstroom ongehinderd kon passeren om opgevangen te worden in 15 ml van een ethanolamine-2 methoxyethanol mengsel (Jeffay 1961). Door nu 3 ml van dit $^{14}CO_2$-bevattende mengsel toe te voegen aan een Tolueen/P.P.O/.P.O.P.O.P./2-methoxyethanol-scintillatiemengsel zou de hoeveelheid ^{14}C van het verbrande algenfragment bepaald kunnen worden (Scintillatietelling met kanaalversterking C 800).

Bij verbranding van ^{14}C-sucrose-standaards bleek het optredend rendement niet hoger dan $\pm$ 20% te zijn.
Aanvankelijk kon niet uitgemaakt worden of dit kwam doordat $^{14}CO_2$ ontsnapte of niet kwantitatief geabsorbeerd kon worden.

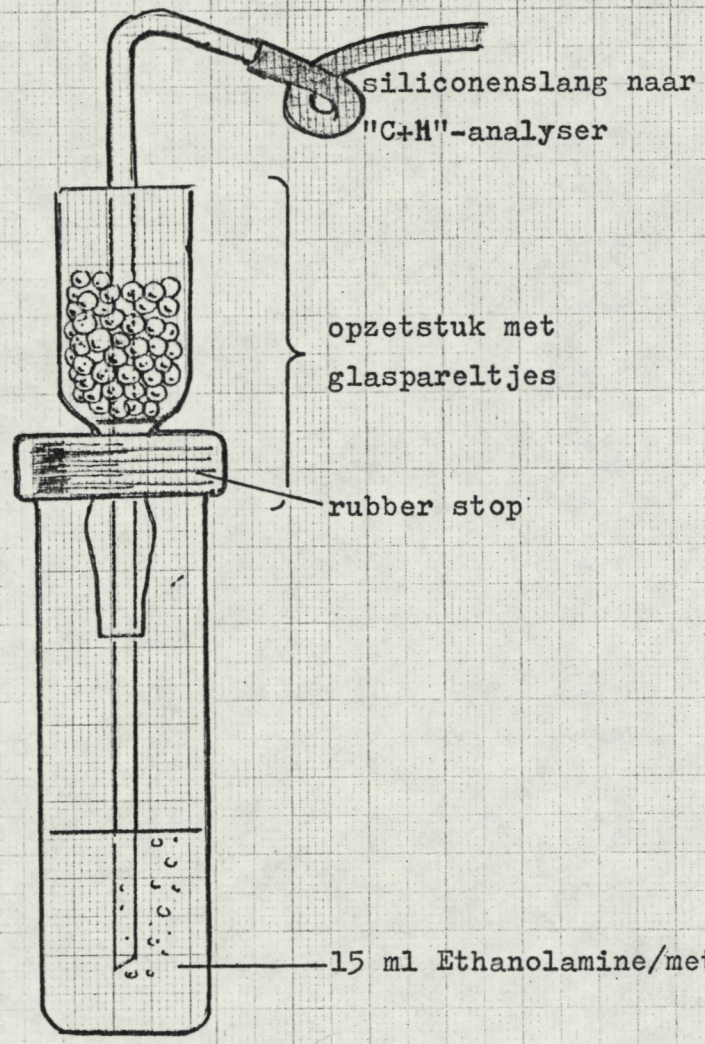


FIG.5:"JAN HEGEMAN CO_2-ABSORPTION KIT"

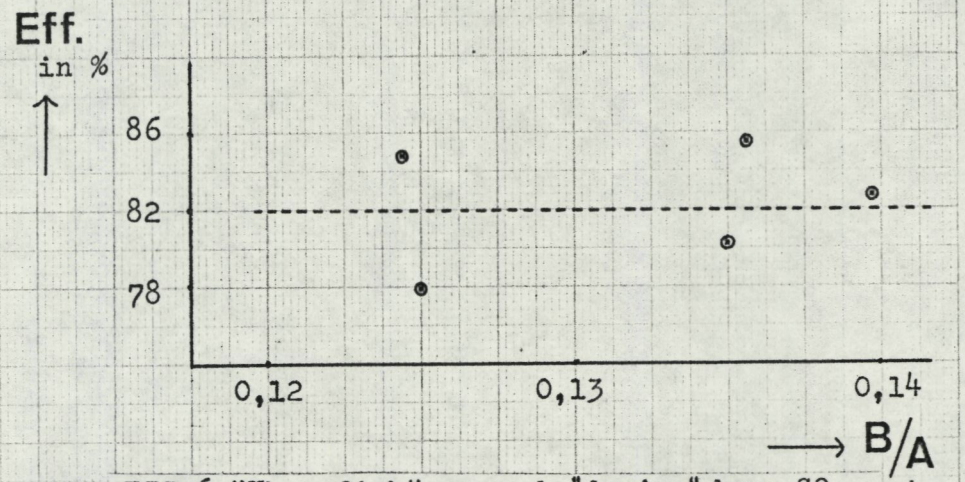


FIG.6:"Ykgrafiek" voor de "doving" door CO_2.

Gebleken was namelijk, dat het Coleman verbrandingsapparaat soms om onverklaarbare redenen niet naar behoren functioneerde.

Toen in januari 1974 echter de "Jan Hegeman CO_2 Absorption Kit" ontwikkeld werd (zie fig.5) bleek het, waarschijnlijk door het door de glaspareltjes sterk vergrote absorptie-oppervlak, mogelijk om ^{14}C-sucrose standaards te verwerken met een vrijwel constant tel-rendement van 80%.

Vervolgens werd de doving door(de bij verbranding van algmateriaal ontstane) CO_2 onderzocht.
Hiertoe werden oplopende hoeveelheden Ulva verbrand. De ontstane CO_2 werd geabsorbeerd door het ethanolaminemengsel. Hiervan werd 3 ml toegevoegd aan telpotjes met 50 µl ^{14}C-sucrose standaard.

Hierbij bleek, dat de efficiëncy vrijwel constant bleef bij verbranding en telling van verschillende hoeveelheden Ulvamateriaal, en ook bij verwerking van 21 mg Ulva dezelfde waarde had als bij telling van het ethanolaminemengsel dat géén CO_2 bevatte (zie ook fig.6).
m.a.w.: doving door CO_2 kan als verwaarloosbaar beschouwd worden, zodat het rendement van het te behandelen monster hetzelfde is als het rendement dat optreedt bij verwerking van een ^{14}C-sucrose standaard.

Het volgende experiment bewijst de betrouwbaarheid van deze verbrandingsmethode.

Slib met fytobenthos werd gedurende een aantal uren geïncubeerd met ^{14}C.
Hierna werden oplopende hoeveelheden van dit slib in de verbrandingsbuis gebracht, waarbij alle, inmiddels tevens radioactieve, organismen werden omgezet in o.a. $^{14}CO_2$. Dit werd opgevangen in het ethanolaminemengsel en geteld.
Tevens werd het C-gehalte per mg slibmonster bepaald.
De volgende waarden werden gevonden:

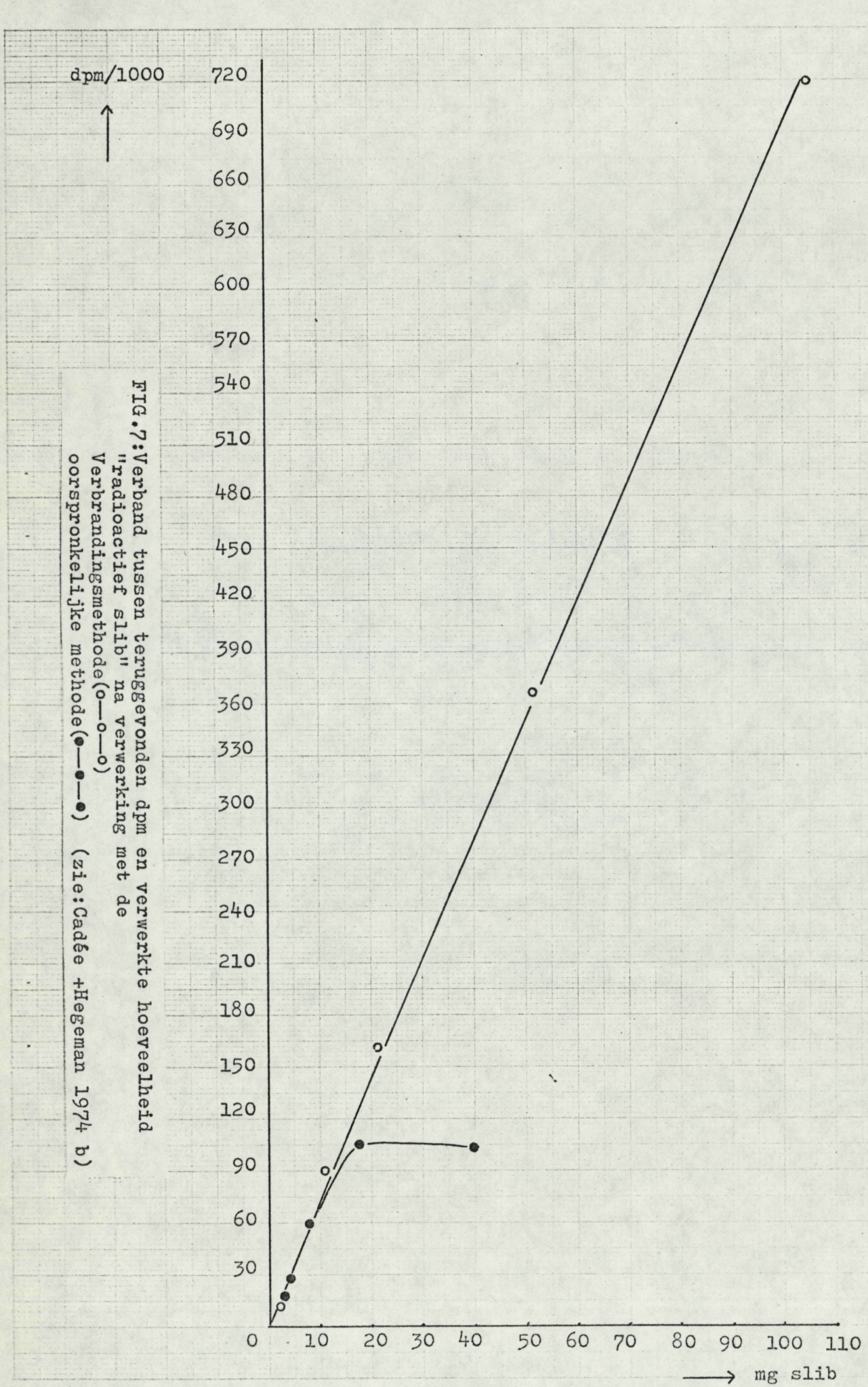


FIG.7: Verband tussen teruggevonden dpm en verwerkte hoeveelheid "radioactief slib" na verwerking met de Verbrandingsmethode(o—o—o) oorspronkelijke methode(●—●—●) (zie: Cadée +Hegeman 1974 b)

Tabel 9. Verbranding van in slib aanwezig fytobenthos tot $^{14}CO_2$

mg slib	mg C	dpm (82% eff.)
2,34	0,49	14280
6,27	1,32	39960
12,43	2,61	87030
23,35	4,90	162360
52,00	10,92	372820
105,86	22,23	721030

Fig.7 toont het lineair verband tussen gevonden dpm en de hoeveelheid slib die verbrand werd. Deze lineariteit gold bij de tot dan toe gebruikte "Potterbuis-methode" voor fytobenthos alleen voor kleine hoeveelheden slib.

De ontwikkelde verbrandingsmethode voldoet dus goed.

V 4. HANDLEIDING VOOR DE "VERBRANDINGSMETHODE"

De procedure is als volgt:

(1) Breng het te verbranden algenmonster in de verbrandingsbuis en klem deze in de "Coleman C + H-Analyser"

(2) Vul het vloeistofreservoir van de "Absorption Kit" (fig.5) m.b.v. een 15 ml pipet; laat het absorptiemengsel (Ethanolamine (BDH) + 2-methoxyethanol in verhouding 1 : 2) over de glaspareltjes door het opzetstuk heen lopen, hiermee wordt bereikt dat alle pareltjes door de vloeistof bevochtigd worden.
Laat het opzetstuk los bovenop het vloeistofreservoir liggen!

(3) Druk de rubberstop vast op het vloeistofreservoir, bevestig de siliconenslang aan de gasuitlaat (onder de plaats van de C-absorptiebuis) van de Coleman C + H-Analyser". Invetten met wat siliconenvet.

(4) Zet de "Coleman C + H-Analyser" op: "Start"

(5) Na voltooiing van de verbrandingscyclus: maak siliconenslangetje los en spoel het ^{14}C-houdende absorptiemengsel m.b.v. een tweede flesje enige malen over de glasparels.

(6) Breng 3 ml van dit mengsel in een telpotje met 15 ml telmengsel (tolueen, (0,5% P.P.O/0,05% P.O.P.O.P)/2-methoxyethanol)

(7) Tel in de "Nuclear Chicago-Mark I Liquid Scintillation Counter" bij kanaalversterking C 800.

Productie/mg alg wordt gegeven door:

$$\frac{\text{dpm} \times 1{,}05 \times 1{,}225}{\text{dpm toegevoegd} \times \text{gew.alg}} \times 5 = \ldots\ldots \text{ mg C/mg alg}$$

met: 1,05 voor isotoopcorrectie; 1,225 = hoeveelheid C (in mg) in 50 ml zeewater); factor 5 omdat 3 ml van de 15 ml absorptiemengsel geteld is.

V 5. OVERZICHT VAN DE PRODUCTIEMETINGEN MET DE ^{14}C-METHODE

De naderhand ontwikkelde en betrouwbaar gebleken verbrandingsmethode maakte verwerking van het nog aanwezige radioactieve algenmateriaal mogelijk. Alle productiewaarden: zie tabel 10.

30-8-1973: parallel aan de O_2-metingen (zie ook blz. 13) werden drie series, elk bestaande uit één L.B. + één D.B. geïncubeerd.

25-9-1973: twee halve-dagseries, plaats: Balgzand

18-10-1073: N.I.O.Z.-wad. Twee series, de eerste serie kon door het ruwe weer niet uitgenomen worden, daarom vrij lange incubatie.

13-12-1973: N.I.O.Z.-wad. Slechts één serie ingezet vanwege de verwachte lage productie.

Tabel 10. ^{14}C-productiewaarden van augustus - december 1973

datum		incubatie-periode	plaats	licht-energie	prod.in µg C/mg alg
30-8	serie 1	6.00u-11.00u	Balgzand	6,8	3,1
	serie 2	11.00u-15.00u	"	16,6	16,1
	serie 3	15-00u-19-30u	"	44,1	6,2
	Dagtotaal			67,5	25,4
25-9	serie 1	7.00u-13.15u	Balgzand	61,8	71,2 ± 21,4
	serie 2	13.15u-19.00u	"	61,5	67,0 ± 14,5
	Dagtotaal			123,3	138,2 ± 25,85
18-10	serie 1	7.30u-15.00u	N.I.O.Z.	28,4	17,8 ± 1,8
	serie 2	15.00u-18.00u	"	3,4	3,3 ± 1,1
	Dagtotaal			31,8	21,1 ± 2,11
13-12	serie 1	9 .00u-16-30u	N.I.O.Z.	3,3	2,4 ± 0,9
	Dagtotaal			3,3	2,4 ± 0,9

VI 1. VERGELIJKING VAN O_2-METHODE (WINKLERTITRATIE) en ^{14}C-METHODE

Doordat productiemetingen volgens de O_2-methode en de ^{14}C-methode gebaseerd zijn op verschillende fotosynthetische deelreacties is het mogelijk dat vergelijking van productiewaarden die met deze beide methoden verkregen zijn, afwijkingen te zien zal geven.

In het onderstaande gedeelte worden vergeleken:

1. productiewaarden van 30-8-1973, toen beide methoden naast elkaar toegepast werden; (^{14}C-gegevens verkregen met de "Verbrandingsmethode")
2. resultaten van een carrousselexperiment van 26-10-1973 waarbij zes O_2-L.B.'s; vijf ^{14}C-L.B.'s en één ^{14}C-D.B. gedurende 150 min werden geïncubeerd, bij 18°C. (^{14}C-gegevens verkregen met de "Potterbuismethode").

Opgemerkt moet worden, dat op 30-8-1973 per serie slechts één ^{14}C-L.B. werd geïncubeerd omdat er nog geen methode was om het radioactieve algenmateriaal te verwerken. Het vergelijkingsmateriaal voor O_2-methode en ^{14}C-methode is dan ook niet overvloedig. Bij omrekening van µgat O naar µg C werd uitgegaan van PQ = 1. Dan is 1 µgat O vrijgekomen ≈ 6 µg C gefixeerd. Gevonden werd:

Tabel 11. Vergelijking O_2-methode met ^{14}C-methode

	nettoprod. in µgat O/mg alg	prod. in µg C/mg alg	
		verwacht met PQ=1	gevonden
30-8-1973			
serie 1	0,90 ± 0,21	5,4	3,17
serie 2	2,68 ± 1,32	16,1	16,10
serie 3	1,47 ± 0,46	8,8	6,28
carr.exp.van 26-10-1973	1,41 ± 0,12	8,5	8,26 ± 1,41

De gevonden waarden geven bij vergelijking geen reden tot ontevredenheid, gezien in het licht van de schaarsheid van de hoeveelheid vergelijkingsmateriaal. Ook moet opgemerkt worden, dat geen excretie van ^{14}C-gelabeld materiaal werd gemeten, hierdoor

zouden de gevonden waarden dichter bij elkaar hebben kunnen liggen.
De in het volgende gedeelte beschreven Gilson Respirometer-proeven leveren nog wat meer gegevens waardoor twee productie-metingsmethoden vergeleken kunnen worden.

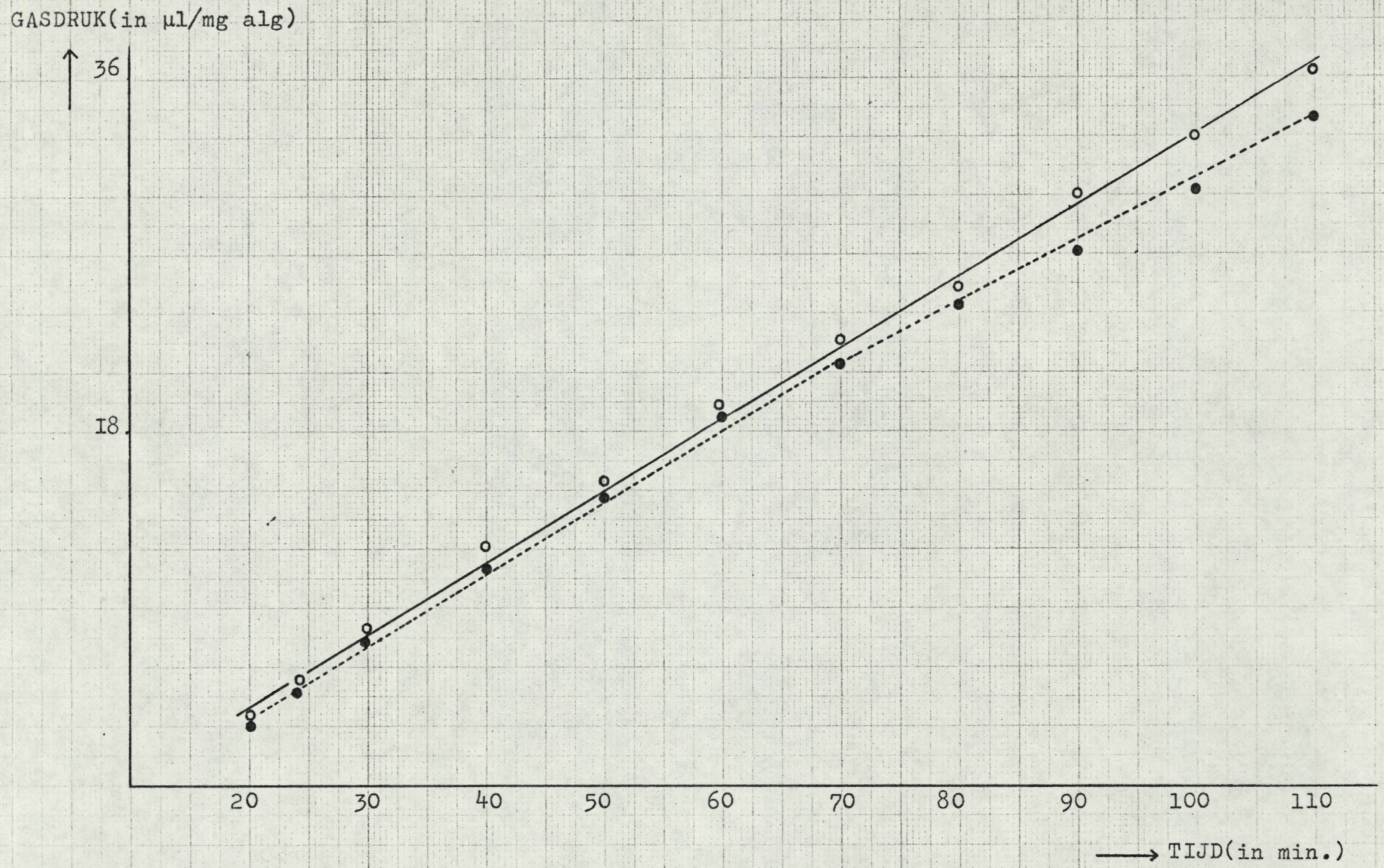


FIG.8A:Verband tussen GASDRUK(in µl/mg alg) en tijd bij belichting van ULVA-schijfjes in de Gilson Respirometer(20 ml zeewater)

VI 2. GILSON RESPIROMETER EN ^{14}C-METHODE

Productiewaarden verkregen met de ^{14}C-verbrandingsmethode en de Gilson Differentiële Respirometer werden met elkaar vergeleken. Om na te gaan welk gasdrukverloop optreedt bij de belichting van Ulva-schijfjes werd het volgende testexperiment gedaan:

Exp.1: Geïncubeerd werden twee Ulva-schijfjes, elk in een respirometervaatje met 20 ml zeewater, bij 18°C. Het geheel werd geschud om een goede gasuitwisseling tussen vloeistof- en gasfase te bewerkstelligen. Voordat begonnen werd met de eigenlijke gasdrukaflezingen werd het systeem in staat gesteld om enige tijd te equilibreren, zodat de gasuitwisseling een "steady state" zou kunnen bereiken. Dan werd, beginnende bij t=20, elke 10 minuten een aflezing gedaan tot t=110 (t in min).

Indien de gevonden waarden worden uitgezet tegen de tijd, krijgen we fig. 8A.

Er blijkt een redelijk lineair verband te bestaan tussen de gasdruktoename en de tijd.

Tijdens deze incubaties vinden in de respirometervaatjes twee simultaan verlopende processen plaats:
1. Fotosynthese, waarbij O_2 wordt gevormd en CO_2 verdwijnt,
2. Respiratie, waarbij CO_2 wordt gevormd en O_2 verdwijnt.

Doordat CO_2 een component is van het in het water aanwezige bicarbonaatevenwicht en daardoor veel sterker oplosbaar is dan O_2, mag aangenomen worden dat de gemeten gasdrukveranderingen toe te schrijven zijn aan veranderingen in de O_2-partieeldruk in de gasfase, m.a.w. de gevonden waarden zijn een maat voor de nettofotosynthese.
Dit geldt alleen indien geen veranderingen in de CO_2-partieeldruk in de gasfase optreden, aan deze voorwaarde zal bij korte incubatietijd voldaan moeten kunnen zijn.

De lineaire gasdruktoename die in fig. 8A wordt gedemonstreerd is in overeenstemming met de resultaten die weergegeven worden in fig.2, waar immers ook een lineair verband tussen zuurstoftoename en incubatietijd werd geconstateerd.
Hierbij kunnen we twee mogelijkheden onderscheiden:

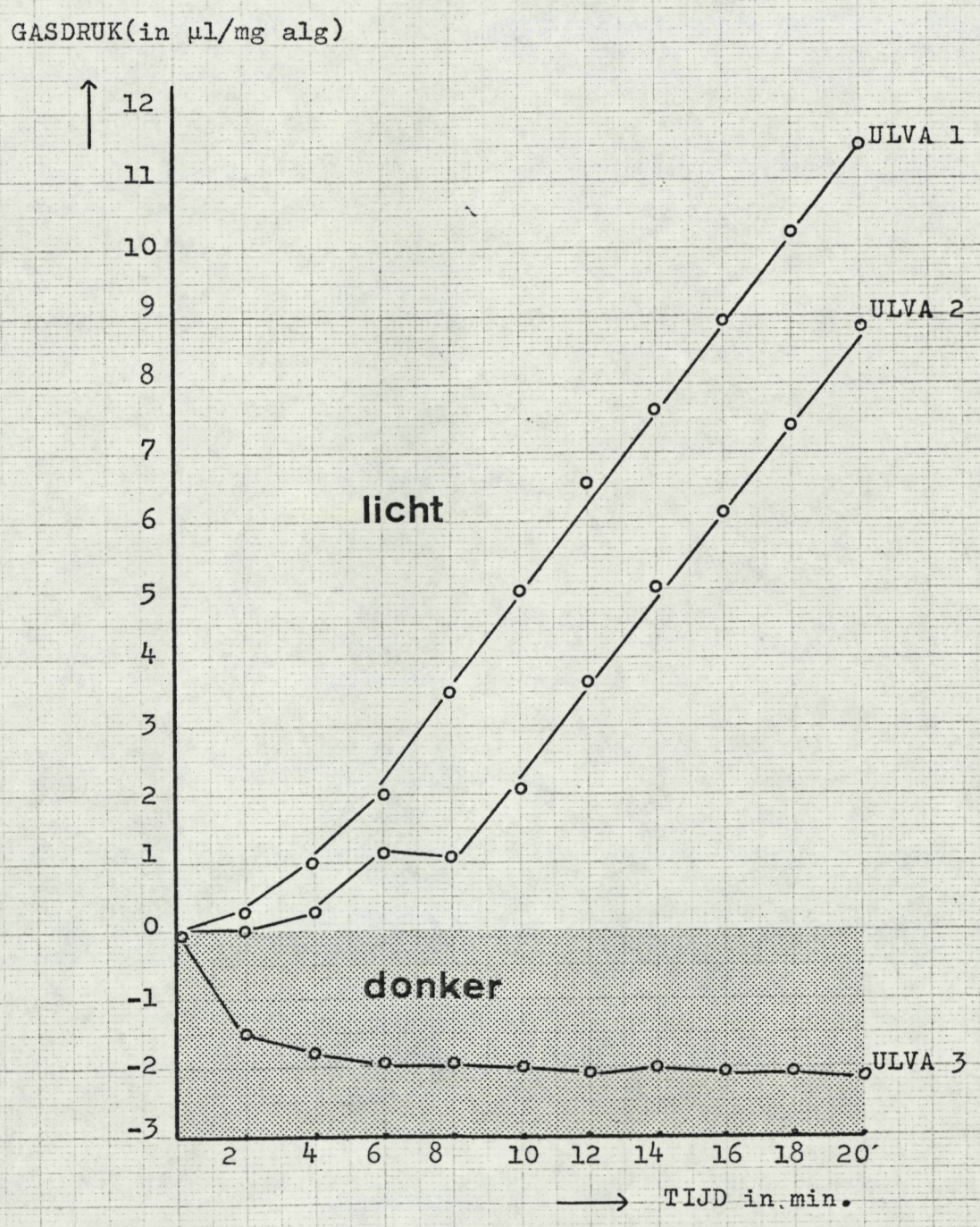


FIG.8B:Verband tussen GASDRUK(in µl/mg alg) en tijd bij de incubaties van ULVA 1;ULVA 2 en ULVA 3 in de Gilson Respirometer(20 ml z.w.)

1. Per tijdseenheid ontstaat door fotosynthese een constante hoeveelheid O_2, terwijl door respiratie een constante hoeveelheid O_2 verdwijnt. Als nu de fotosynthetische activiteit groter is dan de respiratie, zal er een nettogasdruktoename (bruikbaar als maat voor de netto-fotosynthese) optreden die in de tijd lineair is.

2. Fotosynthese en respiratie zijn niet constant in de tijd, maar veranderen beide per tijdseenheid met een zelfde factor, zodat de nettogasdrukverandering in de tijd constant is.

De tweede mogelijkheid vervalt op grond van de productiewaarden die met de ^{14}C-methode gemeten worden (zie blz. 23), terwijl ook bij langere incubatie (zie blz. 12) de D.B.'s geen excessieve waarden voor het O_2-verbruik opleverden.

Uitgegaan werd dan ook van de eerstgenoemde mogelijkheid, zodat verwacht werd dat donker-incubatie van een Ulva-schijfje in 20 ml zeewater een lineaire gasdrukafname, een maat voor de respiratie, zou opleveren. Door nu de constante respiratiewaarde per tijdseenheid op te tellen bij de waarde van de nettofotosynthese per tijdseenheid zou een waarde voor de brutofotosynthese bepaald kunnen worden.

Drie nieuwe Gilson Respirometer-proeven werden gedaan:

Experiment 2:
Drie Ulva-schijfjes werden in respirometervaatjes met 20 ml zeewater gebracht. Eén der bakjes werd omwikkeld met aluminiumfolie. Na toevoeging van 1 µCi ^{14}C werd in de twee "licht"-vaatjes, bevattende "Ulva 1" en "Ulva 2" gasdruktoename, en in het "donker"-vaatje, met "Ulva 3", een gasdrukafname gemeten (zie fig. 8B). De ^{14}C-opname werd bepaald m.b.v. de "Verbrandingsmethode" (zie blz. 22). Gekozen werd voor een korte incubatieduur, nl. 20 min, om geen verandering in de CO_2-partieeldruk in de gasfase te krijgen.

Experiment 3:
Na toevoeging van 1 µCi ^{14}C werden de gasdrukveranderingen bewerkstelligd door "Ulva 4" (licht) en "Ulva 5" (donker), allebei in 20 ml zeewater, gemeten. Duur van de incubatie: 56 min (fig. 8 c). Verwerking van de radioactieve alg geschiedde, na drogen en wegen, met de "Verbrandingsmethode".

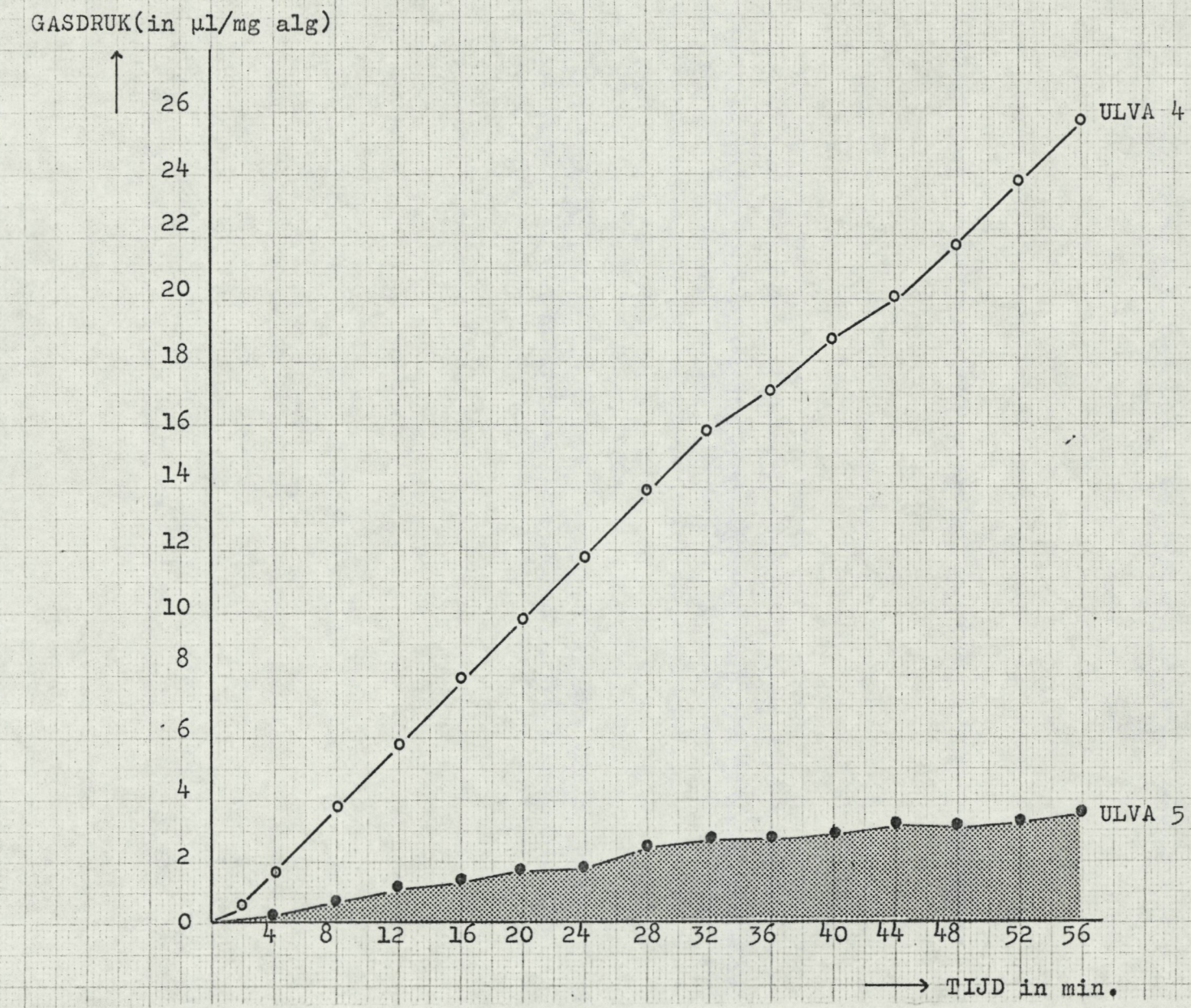


FIG.8C: Verband tussen GASDRUK(in µl/mg alg) en tijd bij de incubaties van ULVA 4(belicht) en ULVA 5(donker) in de Gilson Respirometer. (20 ml zeewater)

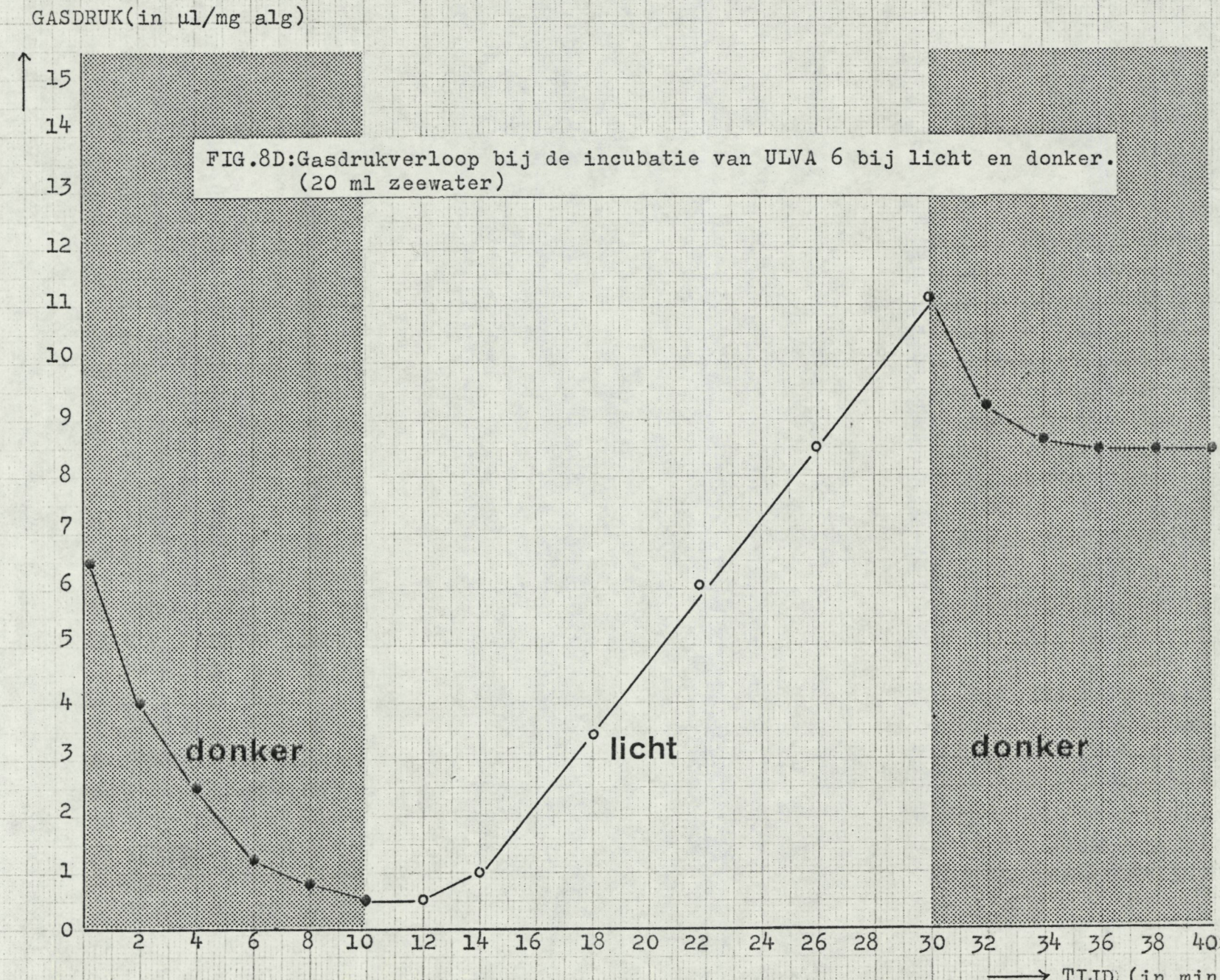


FIG.8D:Gasdrukverloop bij de incubatie van ULVA 6 bij licht en donker.
(20 ml zeewater)

Bij deze beide experimenten werden de respirometervaatjes niet in staat gesteld om te equilibreren; omdat de ^{14}C-opname op t=o begon moest ook het gasdrukverloop vanaf t=o gemeten worden. Duidelijk is, dat zich na korte tijd een evenwicht instelt waarbij in de "licht"-vaatjes een constante gasdruktoename/tijdseenheid optreedt. De nettoproductie/tijd kan hieruit zonder probleem worden bepaald.

Experiment 4:
Hierbij werd een fotosynthesemeting gedaan zoals beschreven door Stauffer (zie Umbreit et al; 1964).
Brutofotosynthese wordt bepaald door sommatie van het gemiddelde van twee "donker"waarden en één "licht"waarde (fig. 8D).

De volgende productiewaarden werden gevonden:

Tabel 12. Gilson Respirometer-Productiemetingen

	incubatie-tijd in min.	prod.in µl O_2/mg alg	prod.in µg C/mg alg (L.B.-D.B.)
Ulva 1	20	13,2	6,7
Ulva 2	20	13,2	6,9
Ulva 4	56	28,5	15,8

In geen der gevallen kon excretie van ^{14}C aangetoond worden (zie blz. 31).

Omdat de productiemetingen met de Gilson Respirometer gebaseerd zijn op drukveranderingen die geïnduceerd worden door vrijkomende zuurstof ten gevolge van de fotosynthetische lichtreactie, terwijl de productiemetingen met ^{14}C bepaald worden door de intensiteit van de CO_2-fixatie, een andere deelreactie, lijkt het niet verstandig om op grond van de waarden van tabel 12 over te gaan tot het vaststellen van PQ- (= fotosynthetisch quotient)-waarden.

Uit de figs 8B, 8C en 8D bleek, dat bij donkerincubatie geen lineaire gasdrukafname/tijdseenheid optrad, in een aantal gevallen werd in het geheel geen gasdrukafname gemeten (fig. 8B, fig.8D), terwijl volgens fig.8C in het donker zelfs gasdruktoename werd gevonden (Ulva 5). Indien geen verdere gasdrukafname wordt ge-

vonden, zou het mogelijk kunnen zijn dat er een dermate sterke respiratie optreedt, dat CO_2 in de gasfase terechtkomt.
Een andere mogelijkheid is, dat de respiratie snel afneemt, doordat een "pool" van gemakkelijk veradembaar substraat, die bij normaal lopende fotosynthese voortdurend wordt aangevuld, opraakt. In dit geval zou, bij langere donkerincubatie, na enige tijd weer gasdrukafname gemeten moeten worden.
Om een dergelijke koppeling tussen fotosynthese en respiratie te bestuderen zijn langer durende proeven nodig, terwijl het ook verstandig is om eventueel in de gasfase belandend CO_2 te absorberen met een KOH-papiertje.
Op grond van de gevonden respiratiewaarden, die niet per tijdseenheid constant waren, lijkt het niet mogelijk om exacte brutoproductiewaarden te geven. De in tabel 12 opgegeven productiewaarden zijn dan ook Nettoproductiewaarden.

Als we er vanuit gaan dat de in exp.2 gevonden ^{14}C-productiewaarden door de relatief korte incubatietijd dichter bij de bruto- dan bij de nettowaarden zullen liggen omdat er een zeker tijdsbestek nodig is voordat eenmaal geassimileerd ^{14}C na respiratie vrijkomt om opnieuw ingebouwd te worden, kunnen we de volgende, enigszins ruwe, vergelijkingen maken tussen de Respirometerwaarden en de ^{14}C-waarden:

Stel PQ = 1; gedurende de experimenten was T = 18°C,
1 Mol O_2 heeft dan een volume van 23,98 liter.

1 µl O_2 vrijgemaakt = 0,0417 µMol O_2 vrijgemaakt

$$\approx \frac{0{,}0417 \times 12}{1} = 0{,}500 \text{ µg C geassimileerd}$$

Tabel 13. Vergelijking van productiewaarden in µl O_2/mg alg en in µg C/mg alg

	nettoproductie in µl O_2/mg alg	"nettoproductie" in µg C/mg alg P.Q.= 1	"brutoproductie" in µg C/mg alg
Ulva 1	13,2	6,6	6,7
Ulva 2	13,2	6,6	6,9

Omdat bij de nettoproductiewaarden de (ons niet bekende) respiratiewaarden opgeteld moeten worden om de brutoproductiewaarden

te krijgen, zullen de gevonden waarden nog dichter bij elkaar liggen. Hieruit mag geconcludeerd worden dat de toegepaste ^{14}C-methode geschikt is voor productiemetingen.
Uit deze resultaten en de resultaten van blz.24 mag geconcludeerd worden dat de toegepaste ^{14}C-productiemetingsmethode alleszins redelijke resultaten oplevert.

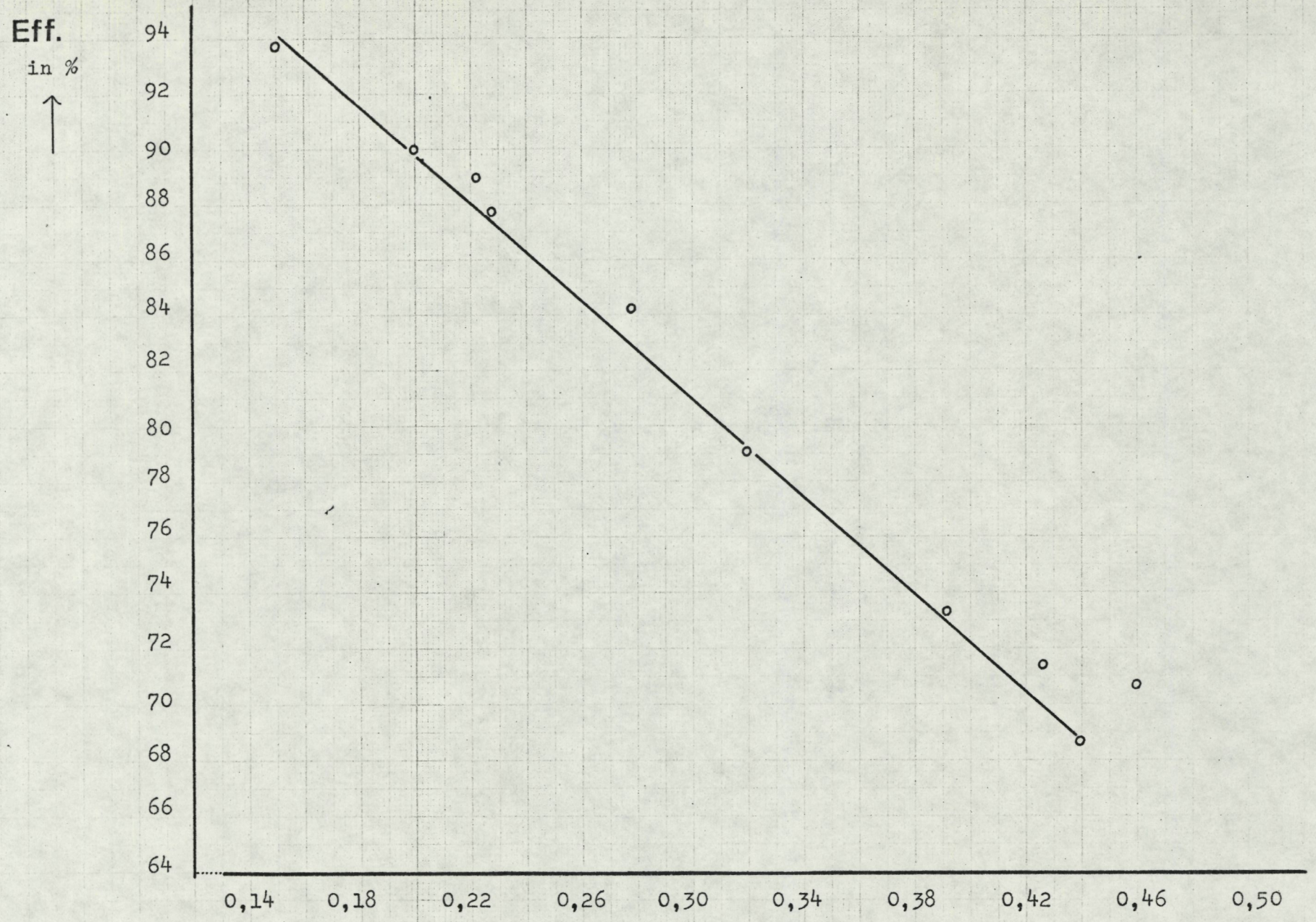


FIG.9:Ykgrafiek voor het scintillatiemengsel TOLUEEN;P.P.O.;P.O.P.O.P.; en BIOSOLV.

VII EXCRETIE VAN ORGANISCH MATERIAAL

Bij het bepalen van de primaire productie volgens de ^{14}C-methode mag niet voorbij gegaan worden aan de excretie van gelabeld organisch materiaal. De waarde van deze excretie, die voor macroalgen op schijnt te kunnen lopen tot 40% (Sieburth 1969) dient opgeteld te worden bij de productiewaarden van de thallusfragmenten.

Bij een aantal metingen werd de excretie bepaald volgens de methode beschreven door Canters (1972).
Door een vergissing waren de incubatieflesjes van augustus en september leeggegooid voordat de eventueel opgetreden excretie was gemeten.

Bij het bepalen van de efficiëncy van de scintillatietelling (bij kanaalversterking E 800) werd gebruik gemaakt van fig. 9.

Bij alle productiemetingen, carrousselexperimenten en U.V.-experimenten werden excretiewaarden gevonden die kleiner waren dan 3% van de gemeten productiewaarden. Toch lijkt het verstandig om bij iedere meting de excretie te bepalen omdat deze afhankelijk kan zijn van de optredende milieuomstandigheden (Watt 1966, Hellebust 1967, Anderson + Zeutschel 1970).

VIII PRODUCTIE-BEÏNVLOEDENDE FACTOREN

Behalve door de hoeveelheid alg in het productieflesje zou de productie beïnvloed kunnen worden door:

1. slechte gasuitwisseling tussen thallusfragment en watermilieu
2. U.V.-licht, dat in staat is om chlorofyl te "bleken" en derhalve onwerkzaam te maken (zie volgende bladzijde).

VIII 1: Gasuitwisseling

Als er geen goede gasuitwisseling bestaat tussen het thallusfragment en zijn omgeving, is het niet onaannemelijk dat de productie lager wordt, omdat de fotosynthetische activiteit van mariene algen berust op het afstaan van O_2 en de opname van CO_2. Als het zeewater waarin geïncubeerd wordt volledig in rust is, zal zich rondom het thallusfragment een soort "huid" van zuurstof vormen, waardoor de toetreding van CO_2 belemmerd wordt.
Indien nu, door beweging van het incubatieflesje, een goede menging van gassen en nutriënten kan optreden, mag verwacht worden dat de productiewaarden hoger liggen (zie ook: Unesco 1973).

Deze effecten zijn aangetoond met carrousselexperimenten waarbij in het ene geval de flesjes niet in beweging waren, en in het andere geval ronddraaiden. Dit experiment is één keer met de O_2-methode, en één keer met de ^{14}C-methode gedaan (^{14}C-methode: potterbuis).
Het resultaat geeft de volgende tabel:

Tabel 14. Invloed van het bewegen der productieflesjes op de productiewaarden van Ulva-schijfjes

	O_2-methode	^{14}C-methode
stilstaand	0,83 ± 0,09	3,31 ± 0,86
bewegend	1,41 ± 0,12	8,18 ± 3,10

Het is dus van groot belang dat tijdens de productiemetingen de flesjes bewegen kunnen, zodat in de incubatievloeistof menging kan optreden.

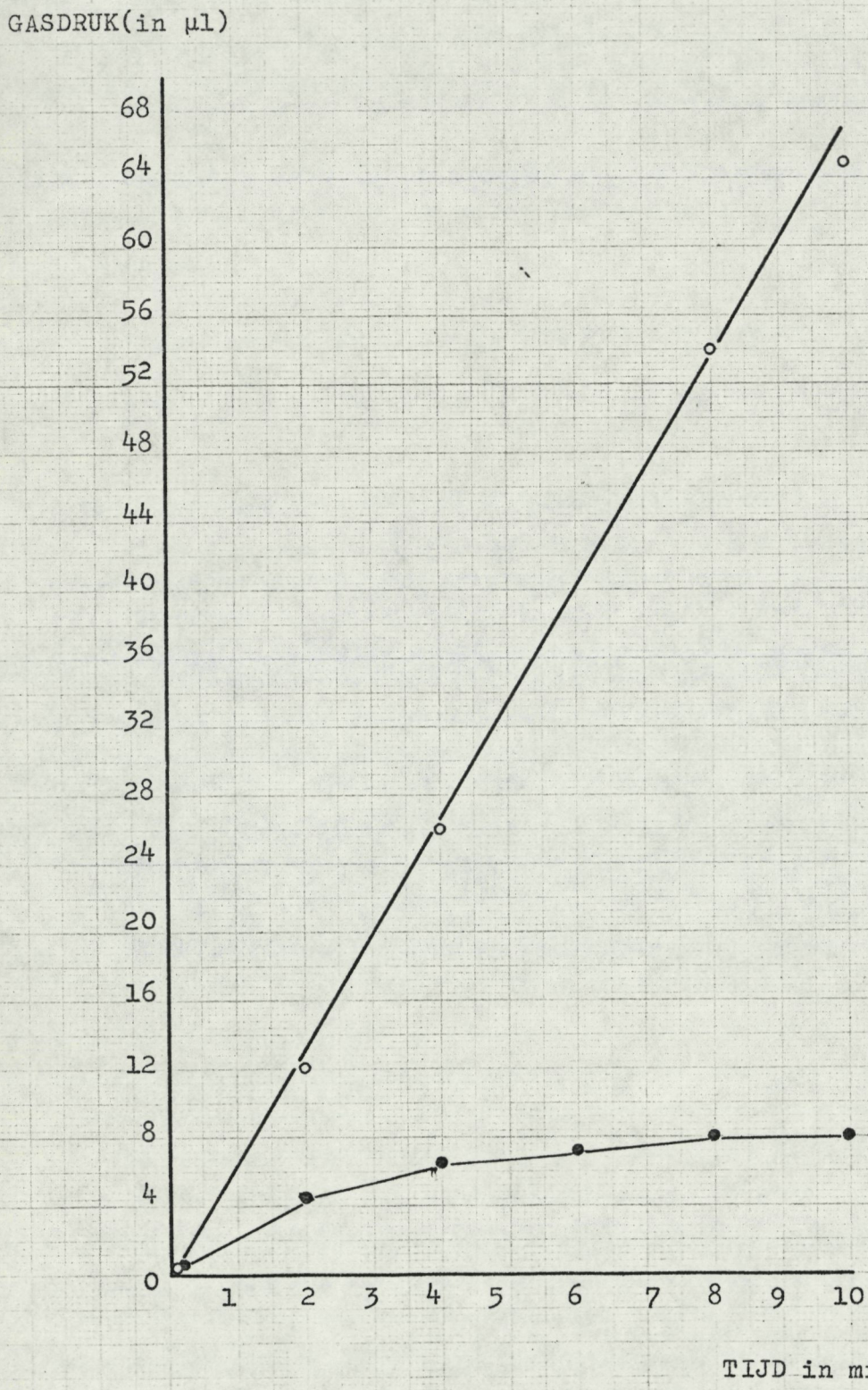


FIG.10: NETTO-GASDRUKTOENAME(in µl) in de Gilson Respirometer bij de belichting van een ULVA-schijfje vóór(o—o—o) en na(•—•—•) blootstelling aan U.V.-straling.

VIII 2: U.V.-straling

Door verschillende auteurs (Findenegg 1966, Steemann Nielsen 1964 b) wordt gewezen op de afname van de fotosynthetische activiteit ten gevolge van bestraling met licht van kleine golflengte (kleiner dan 360 nm). Door deze in het zonlicht aanwezige U.V.-straling treedt "bleaching" van chlorofyl op, terwijl volgens Steemann Nielsen (1964 b) niet alleen de intensiteit der fotochemische deelprocessen van de fotosynthese negatief beïnvloed wordt, maar ook de intensiteit van de enzymatische processen terugloopt.
Omdat de productiemetingen uitgevoerd worden met U.V.-licht absorberende glazen flessen, zouden de gevonden productiewaarden wel eens te hoog kunnen zijn, vooral wanneer een serie flesjes bij laag water en wolkenloze hemel geïncubeerd werd. Een waterlaag absorbeert overigens óók U.V.-straling (Jerlov 1953).
Geprobeerd werd om met de volgende proefjes een "U.V.-effect" op de productiviteit van Ulva-schijfjes aan te tonen.

Exp.1: een Ulva-schijfje werd met 20 ml zeewater in een manometervaatje van de Gilson Respirometer gebracht, waarna de gasdruktoename gedurende 10 minuten werd gemeten. Vervolgens werd het schijfje in een schaaltje met zeewater in de volle zon gezet gedurende twee uur, en werd daarna weer gedurende 10 minuten de nettoproductie gemeten. Het resultaat geeft fig. 10.

Hetzelfde werd gedaan met een ander schijfje, nu werd echter ook, door het manometervaatje m.b.v. alumiumfolie te verduisteren, de respiratie gemeten, zie fig. 11. Opvallend is de sterke respiratie, waardoor de brutoproductie in beide gevallen bijna gelijk is.

Deze proefjes deden een duidelijk "U.V.-effect" vermoeden. Daarom werden op de volgende manier nog vier proeven gedaan:
zes Ulva-schijfjes werden in een schaaltje zeewater buiten in de zon gezet, terwijl drie schijfjes met een glasplaat werden afgeschermd. Tijdens deze incubatie werden solarimeterstanden opgenomen om de lichtenergie te berekenen. Hoewel geen schatting gemaakt kon worden van de hoeveelheid U.V.-straling waaraan de schijfjes waren blootgesteld, werd uitgegaan van de gedachte dat een grotere lichtenergie gepaard zou gaan met een grotere U.V.-bestraling.

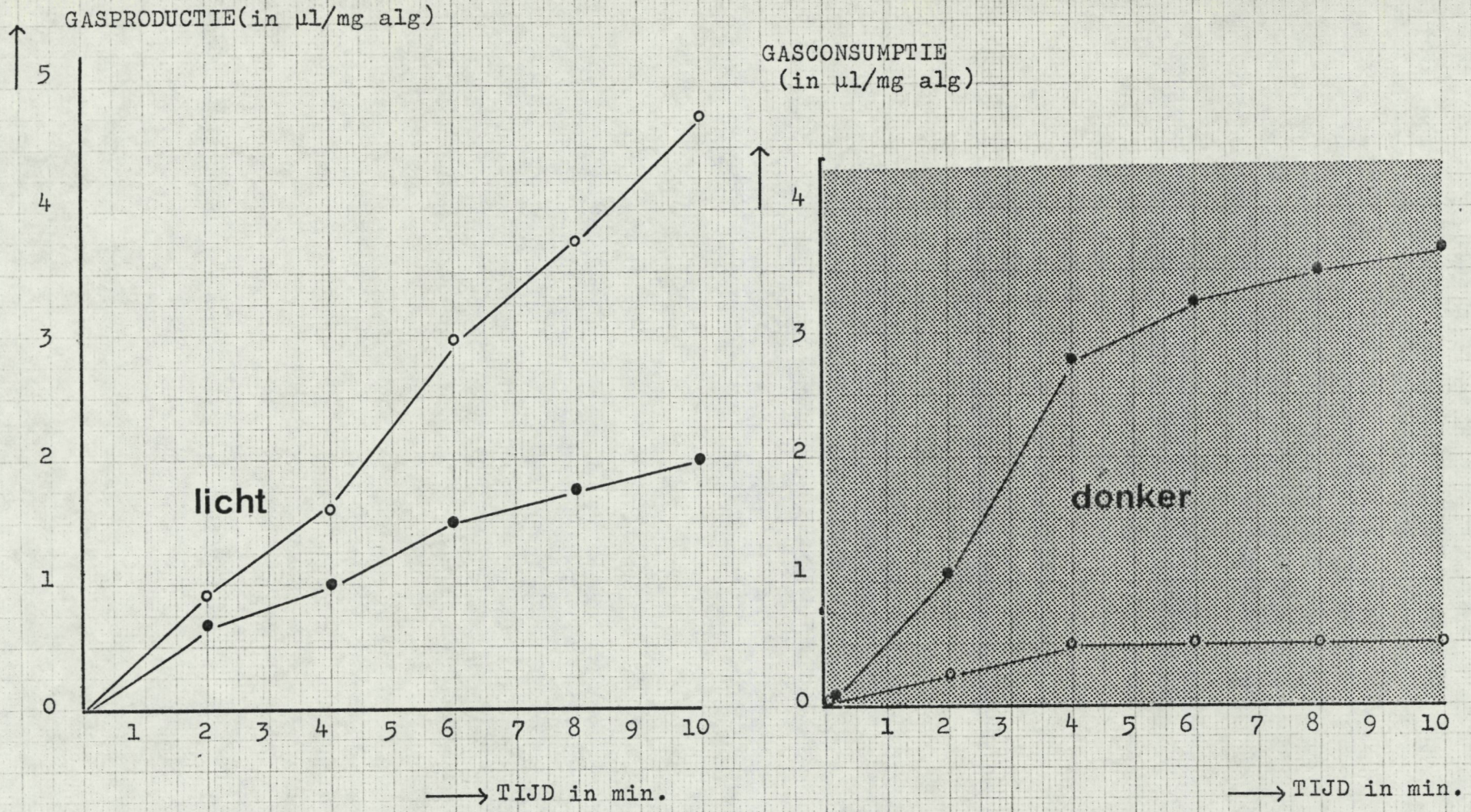


FIG.11:Vergelijking van gasproductie en gasconsumptie(in µl/mg alg) vóór(o—o—o) en na(•—•—•) blootstelling aan U.V.-straling.

Hierna werden de schijfjes elk in 50 ml zeewater met 1 µCI ^{14}C buitengezet. Ook nu werden solarimeterstanden afgelezen om de gemiddelde lichtenergie tijdens de productieperiode te kunnen bepalen.
Na verwerking van de scijfjes werden de volgende productiewaarden gevonden:

Tabel 15. U.V.-bestraling en productie

datum	gem. lichtenergie/uur tijdens bestr.periode	gem. lichtenergie/uur tijdens productieperiode	productie in µg C/mg alg
14.8.1974	25,5	48,4	"glas"17,85±4,83
			"U.V."20,94±1,12
28-8-1974	34,5	32,0	"glas" 6,87±2,49
			"U.V." 9,64±3,21
39-8-1974	56,2	33,6	"glas" 6,67±0,62
			"U.V." 2,36±0,42
3.9.1974	38,2	26,1	"glas" 8,20 -
			"U.V." 6,70 -

"glas": schijfjes niet aan U.V.-straling blootgesteld.
"U.V."_ schijfjes wel aan U.V.-straling blootgesteld.

Uit bovenstaande gegevens is het m.i. onmogelijk een "U.V.-factor" te bepalen. Hiervoor zouden meerdere proeven gedaan moeten worden.

IX CONCLUSIES

Bij de bepaling van het jaarlijks productieverloop van de macro-algen Ulva en Enteromorpha moet op de volgende punten gelet worden.

1. Productiviteit van verschillende thallusdelen kan sterk variëren. Daarom moeten er niet te weinig metingen per tijdsbestek plaatsvinden, waarbij een royaal aantal alg-fragmenten per serie wordt uitgezet. Het gevonden gemiddeld productiecijfer wordt anders te veel bepaald door de toevallige keuze van het te gebruiken algenmateriaal.

2. Raadzaam is om relatief kleine hoeveelheden alg (5 à 6 mg) per flesje te nemen; voor Ulva-productiemetingen is een uitgeponst thallusschijfje met r = 0,5 cm een geschikte eenheid.

3. De flesjes moeten niet geheel met zeewater gevuld worden, opdat het water in het flesje door de waterbeweging buiten het flesje kan "klotsen", hierdoor zal een betere gasuitwisseling mogelijk zijn. Uit tabel 14 blijkt, dat het verschil in productie tussen "stilstaand" en "bewegend" voor de ^{14}C-methode, waarbij het flesje niet geheel gevuld is, groter is dan voor de O_2-methode, waarbij dit wel noodzakelijk is. Gebruik daarom 100 ml flesjes en vul die met 70 ml zeewater. Zorg ervoor dat de flesjes zich niet in de wadbodem "vastwoelen", maar leg ze b.v. op een metalen plaat. Een andere mogelijkheid is het gebruik van gas-impermeabele "Saran-bags" (Unesco 1973).

4. Laat de flesjes hoogstens vijf uur lang buiten liggen i.v.m. de vergelijkbaarheid van L.B. en D.B. wat betreft bacteriegroei en donker-carboxylatie.

5. Meet van ieder flesje de eventueel opgetreden excretie van ^{14}C-gelabeld materiaal, omdat de excretie milieuafhankelijk kan zijn.

X

REFERENTIES

1. Anderson, G.C. & R.P. Zeutschel (1970)
"Release of dissolved organic matter by marine phytoplankton in coastal waters and off-shore arcas of the northeast Pacific Ocean",
Limno. and Oceanogr. 15 (3): 402-407

2. Bunt, J. (1965
"Measurements of photosynthesis and respiration in a marine diatom with the mass spectrophotometer and with carbon-14"
Nature, 207: 1373-1375

3. Cadée, G.C. & J. Hegeman (1974 a)
"Primary production of phytoplankton in the Dutch Wadden Sea"
Neth. Journ. of Sea Research 8 (2-3): 240-259

4. Cadée, G.C. & J.Hegeman (1974 b)
"Primary production of the benthic microflora living on tidal flats in the Dutch Wadden Sea"
Neth. Journ. of Sea Research 8 (2-3): 260-291

5. Coesel, P. (1969): syllabus college Tallophyta, Univ. v. Amsterdam

6. Canters, K.J.: (1972): N.I.O.Z.-intern verslag 1972 - 5

7. Findenegg, I. (1966):
"Die Bedeutung kurzwettiger Strahlung für de planktische Primärproduktion in Seen"
Verh. Int. Verein. Limnol. 16: 314-320

8. Fogg, G.E. (1963):
"The role of algae in organic production in aquatic environments:
Brit. Phyc. Bull. 2: 195-205

9. Gaarder, T. & H.H. Gran (1927)
"Investigation of the production of plankton in the Oslo Fjord"
Rapp. Cons. Explor. Mer 42: 3-31

10. Gessner, F. & F. Pannier (1958)
"Influence of oxygen tension on respiration of phytoplankton"
Limnol. and Oceanogr. 3: 478-480

11. Gupta, G.N. (1966):
"A simple in-vial combustion method for assay of H-3, C-14 and S-35 in biological, biochemical and organic materials"
Anal. chem. 39 (10): 1356-1359

12. Hellebust, J.A. (1967):
"Excretion of organic compounds by cultured and natural populations of marine phytoplankton"
in: G.H. Lauff: Estuaries

13. Jeffay, H. & J. Alvarez (1961):
"Liquid Scintillation Counting of Carbon-14. Use of Ethanolamic-Ethylene glycol monomethyl ether-toluene"
Anal. Chem. 33: 612 e.v.

14. Jerlov, N.G. (1953):
"Influence of suspended and dissolved matter on the transparence of seawater"
Tellus 5; 59-65

15. Kanwisher, J.W. (1966):
"Photosynthesis and respiration in some seaweeds"
in: H. Barnes (ed.): Some contemporary studies in marine science: 407-420.
London. Allen & Unwin.

16. Lorenzen, C.J. (1967):
"Determination of chlorophyll and pheopigment by spectrophotometric equations"
Limnol. and Oceanogr. 14: 343-345

17. Mann, K.H. (1972):
"Macrophyte production and detritus food chains in coastal waters"
Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 29 Suppl.: 353-383

18. Postma, H. (1954):
"Hydrography of the Dutch Wadden Sea"
Archs. Neerl. Zool. 10 (4): 405-511

19. Riley, G.A. (1938):
"Plankton studies I., A preliminary investigation of the plankton of the Tortugas region"
J. mar. Res. 1: 335-352

20. Sieburth, J. (1969:
"Studies on algal substances in the sea III., the production of extracellur organic matter by littoral algae"
Exp. Mar. Biol. and Ecol.: 3 (3): 290-309

21. Steemann Nielsen, E. (1952):
"The use of radioactive carbon (C-14) for measuring organic production in the sea"
J. Cons. Int. Explor. Mer 18: 117-140

22. Steemann Nielsen, E. (1964 a):
"Recent advances in measuring and understanding marine primary production"
J. Ecol. (Suppl.) 52: 119-130

23. Steemann Nielsen, E. (1964 b):
"On a complication in marine productivity work due to the influence of ultraviolet light"
J. Cons. Int. Explor. Mer 29: 130-135

24. Strickland, J.D.H. & T.R.Parsons (1968)
"A practical handbook of seawater analysis"
Bull Fish. Res. Bd. Canada, 167, 311 pp.

25. Talling, J.F. (1960):
"Comparative laboratory and field studies of photosynthesis by a marine planktonic diatom"
Limnol. and Oceanogr. 5: 62-77

26. Theriault, E.J. & P.D. McNamee (1932)
"Dissolved oxygen in organic matter, hypochlorites and sulfite wastes"
Industr. Engng. Chem. (Anal.) 4: 59-64

27. Towle, D.W. & J.S. Pearse (1973):
"Production of the giant kelp, Macrocystis, by in situ incorporation of ^{14}C in polyethylene bags"
Limnol. and Oceanogr. 18 (1): 155-158

28. Umbreit, W.W. et al (1964):
"Manometric Techniques"
4th ed. (Burgess publ.cy) Minneapolis, 306 pp.

29. Unesco (1973):
"A quide to the measurement of marine primary production under some special conditions. Monographs on oceanographic methodology, Unesco Paris (1973)

30. Watt, W.P. (1966):
"Release of dissolved organic material from the cells of phytoplankton populations"
Prov. Roy. Soc. London, 164: 521-551

Errata

blz.	1,	regel	3: microphytobenthos
"	2,	"	16: voedselketens
"	2,	"	18: evertebraten
"	4,	"	26: wad
"	6,	"	22: Hegeman
"	12,	"	27: incubatie
"	33,	"	25: aluminiumfolie
"	34,	"	1: µCi
"	34,	"	5: schijfjes
"	36,	"	6: Limnol.
"	36,	"	24: Kurzwelliger