



BAKTERIELL SYREKONSUMTION

		6.1	<i>Kontrolldiagram</i>
		6.2	<i>Utvärdering</i>
1	Inledning	7	Rapportering
1.1	<i>Bakgrund</i>		
1.2	<i>Princip</i>	8	Utrustning
1.3	<i>Omfattning</i>		
1.4	<i>Störningar</i>	9	Kemikalier och lösningar
1.5	<i>Kontaminationsrisk</i>		
1.6	<i>Säkerhet</i>	10	Referenser
1.7	<i>Övrigt</i>		
2	Förberedelser	11	Tilläggskapitel
2.1	<i>Disk och rengöring</i>		
2.2	<i>Identifiering av prov</i>		
2.3	<i>Reagens</i>		
2.4	<i>Innan kryssning/provtagning</i>		
2.5	<i>Protokoll</i>		
3	Provtagning		
3.1	<i>Provtagning</i>		
3.2	<i>Konservering/uppabetning</i>		
3.3	<i>Förvaring</i>		
4	Metodbeskrivning		
4.1	<i>Reagens</i>		
4.2	<i>Kalibreringslösningar</i>		
4.3	<i>Upparbetning</i>		
4.4	<i>Kalibrering</i>		
4.5	<i>Analysförfarande</i>		
5	Resultatberäkningar		
5.1	<i>Beräkningsformler</i>		
5.2	<i>Resultatberäkningar</i>		
5.3	<i>Mätnoggrannhet</i>		
6	Kontroll och utvärdering		



1 Inledning

Syftet med att skatta bakteriell syrekonsumtion i havsvatten är främst att upptäcka gödning av havsmiljön. Metoden ger indirekt ett mått på den biokemiska syreförbrukningen *in situ*, vilken är kopplad till tillförseln av näring till en recipient (jmf. biokemisk syreförbrukning, BOD₇). Mått på syreförbrukning ger möjlighet att upptäcka ökande biokemisk syrekonsumtion som kan leda till syrebrist. Undersökningstypen kan användas både lokalt i recipienter och i stor skala (Östersjöns delbassänger).

Metoden är publicerad i vetenskapliga tidskrifter och har använts i många akvatiska studier sedan 1982. Den finns beskriven i Helsingforskommissionens riktlinjer för miljöövervakning i Östersjön (Baltic Sea Environment Proceedings No. 27D). Metodiken i denna anvisning använder en vidareutveckling publicerad av Smith och Azam 1992.

1.1 Bakgrund

Bakteriell produktion av biomassa lanserades av Billen et al. (1990)¹ som en indikator på konsumtion av lösta organiska föreningar i ett ekosystem. Produktionen av bakterieplankton påverkas direkt av halt och sammansättning av organiskt material och närsalter i vattenpelaren. En positiv korrelation mellan näringsstatus och bakterievariablerna har generellt visats i akvatiska ekosystem. Ökad produktion av organiskt material genom ökad växtplanktonproduktion och/eller extern tillförsel av löst organiskt material (vattendrag, avlopp) förväntas därmed resultera i en högre syrekonsumtion och en högre biomassa av bakterier. Likaså kan en direkt gödning av bakteriesamhället via begränsande närsalt (främst kväve eller fosfor) förväntas där tillgången på kol och energi är i överskott. Bakteriell syrekonsumtion indikerar därför den realiserade produktionsnivån i en miljö, ett viktigt mått på tillståndet i ett ekosystem.

Bakterieplanktons syrekonsumtion utgör en stor del av den biokemiska syreförbrukningen i akvatiska miljöer. Över 80% av konsumtionen av organiskt kol (eg. sekundärproduktionen) i havet sker i pelagialen och bakterieplankton står för en betydande del av denna². Den faktiska andelen av bakteriell konsumtion (20-50%) varierar mellan olika akvatiska miljöer³. Kolkonsumtion och respiration är tätt kopplade i aeroba organismer (eg. respirationskvoten, RQ, ²). Därmed innebär en hög konsumtion av kolföreningar en hög syrekonsumtion i syresatta miljöer.



1.2 Princip

Skattningen av bakterietillväxt med tymidinmetoden bygger på att icke-fotosyntetiska bakterier specifikt tar upp tymidin genom cellmembranet. Tymidin används för att bilda arvs massa (DNA, **4**, **5**). Syntesen av DNA är strikt kopplad till celledelning. Innan en dubbling av en bakteriecell kan ske, måste dubbelt så mycket DNA ha bildats, och därmed dubbelt så mycket tymidin byggs in i DNA.

Det tymidin som används är märkt med den radioaktiva väteisotopen tritium i den metylgrupp som sitter på tymidin. Mängden tymidin som byggs in i DNA är därför proportionell mot mängden radioaktivitet som tas upp.

Mängden tymidin som tagits upp av bakterierna kan omräknas till antal celler som producerats genom kännedom om hur mycket tymidin som behövs per cell. Teoretiska konversionsfaktorer stämmer relativt väl med experimentellt uppskattade, men ligger vanligtvis något under de senare. Orsaken är att naturligt tymidin inuti cellen späder ut det tillsatta radioaktiva, varvid synteshastigheten av DNA underskattas av teoretiska faktorer. Det faktum att ej alla bakterier tar upp tymidin och att en viss betning av bakterier sker under inkuberingen, bidrar också till en högre konversionsfaktor i praktiken.

Bakteriellt tymidinupptag kan också rapporteras som syrekonsumtion vilket beräknas från celltillväxt via biomassa (se metदानvisning för "Bakteriehalt"), tillväxteffektivitet och respirationskvot (RQ).

1.3 Omfattning

Bakterieproduktion kan mätas i sötvatten såväl som i ocean salthalt (0-35 psu). Kravet är att tillförd tymidin finns i tillräckligt överskott (slut konc. 25 nM i brackvatten) jämfört med naturligt tymidin, samt att omvandlingsfaktorn från upptagen tymidin är riktig ($1.5 \times 10^{18} \pm C.V. 56\%$ celler $[\text{mol tymidin}]^{-1}$ i Bottniska Viken, **6**).

1.4 Störningar

Undvik att utsätta provet för ljus eller temperatur som avsevärt skiljer sig från *in situ* förhållanden före och under inkuberingen. Iskalla (0°C) TCA lösningar och iskalla rör är väsentligt för fällningssteget i metoden. För-kyl alltid dessa. Ett noggrant avlägsnande av övervätskan efter centrifugering är ett kritiskt moment. Provrören ska under denna procedur hållas i rumstemperatur. Använd en dragen pasteur pipett och sug ut vätska ända till botten. Vidrör endast motsatt sida mot den pelleten sitter på, men ända till botten på röret. Avlägsna också små droppar under locket samt imma på väggarna. Använd ej latex handskar, dessa kan ge fluorescens.



1.5 *Kontaminationsrisk*

Arbeta antiseptiskt med sterila tappar och rör. Undvik framförallt att kontaminera tymidin-stamlösningen.

Skydda provet från närhet till ämnen som kan hämma livsprocesserna (exv. formaldehyd, Lugollösning, latexgummi, TCA etc.).

1.6 *Säkerhet*

Isotop

Tritierad [metyl-³H] Tymidin med specifik aktivitet om 80 000 Ci mol⁻¹ och koncentration 12.5 µM (1mCi/ml) används. Isotopen är β-strålande och har en räckvidd på c:a 10 mm i vatten. Skydda ansikte och ögon. Använd handskar och skyddsrock. Isotopen kan i utspädd form spolats ut i vasken.

Triklorättiksyra (TCA)

TCA är frätande på ögon, hud och slemhinnor. Ånga och damm kan irritera och förorsaka lungskada. Använd skyddsmasker och skyddsrock vid uppvägning. Arbeta i dragskåp.

1.7 *Övrigt*

2 **Förberedelser**

2.1 *Disk och rengöring*

Använd väl Milli-Q-sköljda provtagningskärl. Samma rör kan användas vid alla stationer. Provflaskor och lösningar som tillförs provet måste vara rena och ej ha varit i kontakt med biocider (exv. formaldehyd).

Tipparna till EDOS kan användas flera gånger för samma typ av lösning. Märk dem tydligt och skölj dem med MilliQ mellan pipetteringar.

Vid fördelning av provvatten sköljs tappen en gång med aktuellt provvatten.

2.2 *Identifiering av prov*

50 ml polypropylenrör skall vara märkta med provtagningsdjup.

Eppendorfrör märks på locket med station, behandling (prov resp. kontroll) samt provtagningsdjup. Använd vattenfast tusch.

Placera lämpligen proverna stationsvis, behandlingsvis och djupvis för enkel överföring från resultatfil till beräkningsfil.



2.3 *Reagens*

Isotopen

Tritierad [metyl-³H] Tymidin enligt p. 9 används

Triklorättiksyra (TCA)

TCA innehåller mycket kristallvatten. 100% TCA bereds genom att blanda 500 g TCA (Merck, ProAnalysis) med 227 ml Milli-Q-vatten. 5% och 50% TCA bereds från stamlösningen genom spädning med MilliQ vatten.

TCA är frätande på ögon, hud och slemhinnor. Ånga och damm kan irritera och förorsaka lungskada.

Använd skyddsmasker och skyddsrock. Arbeta i dragskåp.

Scintillationsvätska

Toluene- och Xylenfri scintillationsvätska som exv. Pharmacia OptiPhase HiSafe 3, Wallac OY kan användas. Scintillationsvätskan skall kunna blandas med vatten.

Is

Vanlig iskross från ismaskin eller isfack från frys används som kylmedel för TCA rör.

2.4 *Innan kryssning/provtagning*

Före avresa placeras 1.5 ml Eppendorf rör i 5 ml scintillationsburkar i scintillationsrack. Märk rör med vattenfast tusch på lockets översida med kryssning (K#), station, djup och behandling. Placera rören i den ordning som de elektroniskt skall överföras till resultatfil.

Vid provtagningsdagens början startas inkubator för rören och kylcentrifug för att uppnå rätt temperatur. Märk 50 ml polypropylen rör med metod och djup och ställ fram i rack på provtagningsbordet. Ställ fram 2 termosar för inkuberingsvatten märkt med "Över termoklin" och "Under termoklin", respektive. Se till att en dragen pasteurpipett finns kopplad till vattenfälla och vaccumsug i dragskåpet. Arbetsytor skall vara täckta med skyddspapper.

2.5 *Protokoll*

Stationsprotokoll ska skrivas ut innan avfärd för provtagning enligt metodanvisning "Förberedelser".



3 Provtagning

3.1 Provtagning

Vattenprov utförs enligt metodinstruktion ”Provtagning med rosett SBE 32”.

Ett MilliQ-sköljt polypropylenrör sköljs en gång med provvatten innan den fylls med 50 ml prov. Förvara med lock så nära *in situ* temp som praktiskt möjligt till start av inkubering enligt p. 4.4.1.

Fyll termosar med vatten från yt- resp. djupvatten och använd för inkubering av prover från provdjup med liknande temperatur.

3.2 Konservering/upparbetning

Upparbetning utförs inom 1 timme enligt punkt 3.3 och 4. Vid exv. dåligt väder kan upparbetning vänta upp till 8 timmar, notera när inkubationen startar.

3.3 Förvaring

50 ml flaskor förvaras efter provtagning mörkt så nära *in situ* temperatur som möjligt. Kylskåp eller rumstempererat skåp kan nyttjas.

Prov i eppendorfrör med 50% TCA tillsatt kan förvaras i kylinkubator eller kylskåp upp till 7 dygn.

Eppendorfrör med fällt, TCA olösligt material, upplöst i scintillations vätska kan förvaras i rumstemperatur och mörker till scintillationsräkning. Bör räknas inom 5 dygn.

4 Metodbeskrivning

4.1 Reagens

Gör 50% (w/v) TCA och 5% (w/v) TCA i tillräcklig mängd för en kryssning. Förvara TCA i 50ml polypropylenrör i isbad i kylskåp under hela upparbetningen. Ta ut den mängd Tritierad [metyl-³H] Tymidin som behövs för en station i ett Eppendorfrör.

4.2 Kalibreringslösningar

Inga.

4.3 Upparbetning

-

4.3.1 Förberedelser

Sätt på kylcentrifugen (4°C) för att kyla rotorn. Centrifuger utan kylning kan ställas i kylskåp. När inkubator ”Eppendorf ThermoStat plus” används ställs den på 2°C. Om kylblock används kyls detta i frysen (-20°C) minst 1 timme före användning.



4.3.2 Inmärkning med tymidin

- För varje provdjup fylls två eppendorfrör med 1 ml provvatten vardera med pipett. Se aktuellt provtagningsprotokoll för replikering. Minst 1 prov och 1 kontroll från varje hämtare skall mätas om skattning av vattenpelaren eftersträvas. Skall olika provdjup jämföras rekommenderas motsvarande från 3 hämtare från respektive provdjup. För att följa analytisk precision bör minst duplikat av prov och kontroll tas från något djup eller hel station inom provtagningsprogrammet. Samma tipp kan användas på alla djup, men skölj med provvatten mellan provdjupen.
- Tillsätt med EDOS 100 µl 50% TCA till kontrollrören, blanda 3 s (med provrörs omblandare) och vänta 5 min. TCA avstannar celltillväxt.
- Ta ut den beräknade mängden tymidin från stamflaskan till ett eppendorfrör med steril tipp. (med ¹⁴C-pipetten). Tillsätt sedan 2 µl tymidin först till prover och sedan till kontroller varvid samma tipp kan användas. Placera droppen på väggen ovanför vätskeytan. Blanda 3 s. *Notera tiden för inkuberingsstart samt isotopens specifika aktivitet och batchnr. i protokollet.*
- Inkubera i termosar närmast *in situ* temperatur i 1 timme. Om nedkyllt provrörsblock används, ställ in det i frysen under tiden.
- Avbryt inkuberingen genom att sätta eppendorfrören i "Eppendorf ThermoStat plus" (inställt på 2°C) eller det nedkylda eppstället i 5 min. *Notera tiden* när rören placeras i provstället.

4.3.3 Fällning av bakteriebiomassa med TCA

- Tillsätt med EDOS 100 µl 50% TCA till *proverna* (ej kontroller) och blanda 3 s. *Viktigt att ha TCA-lösningar iskalla!* Låt stå ytterligare 5 min i "Eppendorf ThermoStat plus". Om centrifugering ej kan ske direkt kan proverna kan i detta läge sparas vid 4°C upp till sju dygn.
- Sätt eppendorfrören i en kyld rotor med "nackarna" utåt. Se till att proverna *ej är frysta* när de sätts i centrifugrotorn. Centrifugera eppendorfrören vid 16 000 × g (13 000 rpm, se utrustning) i 10 min, 4°C. Ställ eppendorfstället med övriga prover i kyl (4°C), (om det finns fler prover än centrifugen tar).
- Placera eppendorfrören i ett provrörsställ i rumstemperatur. Avlägsna övervätskan med en dragen pasteurpipett kopplad till vattensug eller vacuum (RADIOAKTIVT, använd sugflaska). Var mycket noga! Den ev. osynliga pelleten finns i botten, på sidan mot rörets "nacke". Vidrör ej pelleten. Avlägsna även kondens och imma i och strax under locket.
- Tillsätt med EDOS 1 ml iskall 5% TCA. Se till att ingen luftbubbla finns i botten av röret så att pelleten tvättas ordentligt. Blanda 5 sekunder. Se till att inte märkningen försvinner under omblandningen.
- Centrifugera eppendorfrören, med "nackarna" utåt, vid 16 000 × g (13 000rpm) i 10 min. Avlägsna supernatet som ovan.



- Tillsätt 1 ml OptiPhase HiSafe 3 till varje rör. Stäng locket och blanda 5 s. Häng ned eppendorfrören i 5 ml plastscintburkar. Förvara enligt p. 3.3.

4.4 Kalibrering

Scintillationsräknaren skall kalibreras med tillhörande standards före prover räknas. Datum för godkänd kalibrering skall föras in i kalibreringslogg och databasen för varje provset. Byt standards när de gått ut.

Fabriksbestämd quenchkurva används.

4.5 Analysförfarande

Scintillationsräkning av proverna görs direkt i de eppendorf-rör som användes vid upparbetningen. Rören hängs ner i 5 ml scintillationsburkar.

Sätt användarnr 1 på första racket som skall räknas och racknummer-etiketter på alla rack med prover i för att proven skall kunna identifieras i utskriften efter analysen. Nummerordningen på racken spelar ingen roll.

Placera proverna på höger sida i scintillationsräknaren med kalibreringsracket (det gula) med de oquenchade proverna 14C, 3H och bakgrundsprovet på position 1, 2 respektive 3 längst in i apparaten och placera stoppracket, det röda, sist (närmast dig). Placera inte några prover i stoppracket då de inte kommer att räknas. Användarnr och racknr etiketterna ska vara vända bort från dej.

Se till att skrivaren som är kopplad till scintillationsräknaren är på och att "on line" indikatorn lyser grönt.

Starta räkningen av proverna genom att markera "Automatic counting" i menyn på bildskärmen på apparaten och tryck sedan start.

Proverna räknas nu, på skärmen syns hur länge provet räknats och vilken aktivitet det har. Skrivaren skriver ut varje prov på en rad. Stoppracket stoppar mätningarna.

Följande inställning av parametrarna skrivs ut vid start av varje räkning av primärproduktionsprover;

ID: 3H, 5MIN, DPM

```
USER : 1 COMMENT:
PRESET TIME : 5.00
DATA CALC : SL DPM H#: : YES SAMPLE REPEATS : 1 PRINTER: : STD
COUNT BLANK : NO IC# : NO REPLICATES : 1 RS232 : OFF
TWO PHASE : NO AQC : NO CYCLE REPEATS : 1
SCINTILLATOR : LIQUID LUMEX : NO LOW SAMPLE REJ : 0
LOW LEVEL : NO HALFLIFE CORRECTION DATE: none
ISOTPE 1: 3H %ERROR: 2.00 FACTOR: 1.000000 BKG. SUB: 0
```




BACKGROUND QUENCH CURVE: Off COLOR QUENCH CORRECTION: On

Quench Limits Low: 2.672 High: 316.80

Proverna räknas i [³H]-fönstret med program för omvandling av CPM till DPM från fabriksdefinierad quench kurva (se p. 4.4).



5 Resultatberäkningar

5.1 Beräkningsformler

5.1.1 Omvandling av DPM till celltillväxt

Mängden (mol) inkorporerad ^3H -tymidin $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ (n_{ty}) beräknas enligt⁵:

$$\Delta n_{\text{ty}} = \frac{(dpm_p - dpm_k) \times 4.5 \times 10^{-13}}{v \times \Delta t \times SA}$$

där

dpm_p = dpm i provet (medelvärde av replikat)

dpm_k = dpm i kontroller (medelvärde av replikat)

4.5×10^{-13} = konverteringsfaktor (dpm ==> Ci)

V = provvolym (ml)

Δt = inkuberingstid (timmar)

SA = specifika aktiviteten för [^3H]-tymidin (Ci/mol)

5.1.2 Bakteriell biomassaproduktion

Tymidinupptag omräknas till bakteriell biomassaproduktion (P_b , mol kol liter⁻¹ dygn⁻¹) med formeln:

$$P_b = \Delta n_{\text{ty}} \times TCF \times m_b \times 24 \times 1000$$

där TCF är tymidin konverteringsfaktorn. För Bottniska Viken används 1.5×10^{18} celler [mol tymidin]⁻¹ baserad på Wikner och Hagström 1999⁷, vilket är nära den teoretiska faktorn för kustvatten och medelvärde för empiriskt bestämda faktorer från olika akvatiska miljöer **4, 8**. Faktorn m_b är kolinnehåll i medeltal per bakterie i provet i $\mu\text{mol C cell}^{-1}$. Se metodanvisningen för "Bakteriehalt" för bestämning av kolinnehåll per bakterie. Faktorerna 24 timmar dygn⁻¹ och 1000 ml liter⁻¹ omvandlar tid och volym till angiven enhet.



5.1.3 Bakteriell syrekonsumtion

Bakteriell syrekonsumtion, ΔO_2^{bact} , beräknas från kolproduktion, bakteriell tillväxteffektivitet, BGE , och respirationskvoten, RQ , enligt:

$$\Delta O_2^{bact} = P_b \times \frac{1 - BGE}{BGE} \times RQ$$

BGE antas för Bottniska Viken i genomsnitt vara 30%, vilket är nära det medelvärde som rapporterats från olika akvatiska miljöer **9, 10**. Respirationskvoten antas vara 0.9 baserat på viktad RQ för konsumtion av kolhydrat (vikt 0.5), Protein (vikt 0.33) och fettsyror (vikt 0.17) **2**. Detta överensstämmer också med erfarenheter från en marin bakterieart under tillväxt **11**.

5.1.4 Standarddeviation

Standarddeviationen (SD_{tot}) för ett provdjup beräknas som kvadratsumman för prov och kontroll replikat enligt:

$$SD_{tot} = \sqrt{(SD_p^2 + SD_k^2)}$$

där SD_p och SD_k är standarddeviationen från prov resp. kontrollrepliket.

5.1.5 Variationskoefficienten

Variationskoefficienten (CV_{tot}) beräknas som:

$$CV_{tot} = \frac{SD_{tot}}{m}$$

Där m är netto dpm baserat på differensen mellan medelvärdet för prov och kontroll.

5.2 Resultatberäkningar

Värden för upptagen tymidin (dpm) för prov och kontroll kopieras in i databas från resultatfil. Nettoupptag av tymidin $ml^{-1} \text{ timme}^{-1}$ beräknas i mallen liksom bakteriell cell-, och biomassaproduktion, samt syrekonsumtion. Mallen skall ge prov och kontroll dpm, medelvärde för netto dpm, \pm standard deviation för både kontrollvärden och prover, samt variationskoefficienten. Bakteriell biomassaproduktion i $mol \text{ C liter}^{-1} \text{ dygn}^{-1}$, syrekonsumtion i $mol \text{ O}_2 \text{ liter}^{-1} \text{ dygn}^{-1}$, samt de koefficienter som används vid deras beräkning anges enligt Tabell 1 (p. 7).



5.3 Mätnoggrannhet

Mätnoggrannhet består av specificitet, precision, robusthet och detektionsgräns. För vissa variabler är också systematiska fel och linearitet av betydelse.

Variationskoefficienten för netto dpm bör ligga under $\pm 20\%$ i produktiva vatten. Under vinterhalvåret kan de ligga något högre. Variationskoefficient över $\pm 60\%$ bör granskas närmare. Bakgrund bör ligga under 150 dpm och i medeltal på 70 dpm. Detektionsnivån ligger på 100 dpm nettoupptag tymidin ($0.02 \mu\text{mol O}_2 \text{ liter}^{-1} \text{ dygn}^{-1}$).

Systematiska felet i bestämningen påverkas främst av omvandlingen från upptaget av tymidin till cellproduktion. Standarddeviationen för skattningen av TCF faktorn (1.5×10^{18} celler [$\text{mol tymidin}]^{-1}$) är $\pm 56\%$ ($n=5$) för prover från Botten viken, Bottenhavet och Örefjärden. En osäkerhet finns också i faktorer för kolinnehåll per cell, tillväxteffektivitet och respirationskvot vid bestämning av syrekonsumtion. Totalt skattas osäkerheten i en bestämning av cell- eller kolproduktion till $\pm 60\%$.

Produktionshastigheter ner till 1×10^7 celler $\text{liter}^{-1} \text{ dygn}^{-1}$ kan mätas (detectionsgräns motsvarande +2 standarddeviationer). Detta motsvarar $0.02 \mu\text{mol liter}^{-1} \text{ dygn}^{-1}$, ungefär lika som kol eller O_2 . Typiska tillväxthastigheter i mesotrofa miljöer är 20 ggr högre.

6 Kontroll och utvärdering

6.1 Kontrolldiagram

Kvalitetskontrollera genom att utvärdera erhållet bakteriellt upptag av tymidin mot djup och tid. Den bör vara rimlig i förhållande till tidigare mätningar motsvarande tid av året. Djupprofilen bör ha ett rimligt utseende med högre värden närmare ytan under produktiva säsongen. Variationskoefficienter skall granskas om de överstiger 3 SD över medelvärde. Hittas felaktighet stryks värdet med motivering, datum och signatur. Hittas inget skäl att stryka provet markeras det med $Q=3$.

Årets hela dataset utvärderas genom att stationsvis plotta i) variationskoefficienten (CV) för varje djup mot Juliansk dag där replikering utförts ii) bakteriellt tymidinupptag i dpm mot Juliansk dag och djup. Avvikande värden rapporteras och diskuteras med den kvalitetssäkringsansvarige enligt ovan. Meddela snarast misstänkta felkällor.

6.2 Utvärdering

Resultaten för bakterieproduktion granskas av kvalitetssäkringsansvarige för kontroll av värdena varefter de blir klara. Avvikande värden ($>3 \pm \text{SD}$) markeras med $Q=3$. Kontrollera att uträknad cellproduktion eller syrekonsumtion är rimlig och passar in bland övriga värden i djupprofilen och årskurvan.

Utvärdering av absoluta värden och variationsmått görs lämpligen efter omräkning till $\text{mol O}_2 \text{ liter}^{-1} \text{ dygn}^{-1}$. Värden som avviker mer än 2 standardavvikelser från övriga närliggande värden i djupprofilen eller årskurvan granskas närmare. Högre värden granskas för ev. felkällor och



enstaka prov som avviker mer än $3 \times SD$ från övriga replikat markeras med $Q=3$, om inte felaktigheter motiverar att provet stryks.

Jämför också värden med $3 \times SD$ konfidensintervall från tidigare år, samt stationer under samma provtagningskryssning. (eg. där samma tymidin stamlösning använts). Om felkällor kan identifieras stryks provet, annars markeras provet som ett extremvärde (3). Var försiktig med att stryka höga värden utan bra motiv.

Meddela omgående felaktiga värden eller ovanliga resultat till kvalitetssäkringsansvarige.



7 Rapportering

Värden förs in i databasen dBotnia. Utskrift av rådata och beräknade värden delges kvalitetssäkringsansvarige. Rådata och beräknade data enligt Tabell 1 skall arkiveras:

Tabell 1. Databasvariabler och enheter:

Storhet	Enhet	Gällande siffror	Funktion	Kategorier	Akronym	Värdeex.
Tymidinupptag	Dpm	3	-	Djup	BGTYMUPT	1000
±Cvtymidinupptag	%	2	Statistik	Djup	BGCVTYUP	5
Tymidinkontroll	Dpm	3	-	Djup	BGTYMCON	40
±Cvtymidinkontroll	%	2	Statistik	Djup	BGCVTYCO	10
Specifik aktivitet	Ci mol ⁻¹	3	-	Djup	BGSPACTY	82000
Faktor radioaktivitet	Ci dpm ⁻¹	3	-	Djup	BGENRAFA	4.50x10 ⁻¹³
TCF [†]	Celler mol ⁻¹	3	-	Djup	BGTCTF	1.50x10 ¹⁸
Provvoly	Milliliter	3	-	Djup	BGSAMVOL	1
Tid för inkuberingsstart	tt.mm	4	-	Djup	BGINCST	10.18
Tid för inkuberingslut	tt.mm	4	-	Djup	BGINCSP	11.20
Instr.kalibr.sdatum	01-09-26	6	-	Djup, standard	BGICD	01-10-04
Bakteriell cellproduktion	Celler l ⁻¹ dygn ⁻¹	3	5.1.1	Djup	BGCELLP	1.84x10 ⁸
Bakt. Prod. ±CV	%	2	5.1.4, 5.1.5	Djup	BGCCELCV	11
Bakteriekolproduktion	µmol kol liter ⁻¹ dygn ⁻¹	3	5.1.2	Djup	BGCARPR	0.29
Bakt. Kol ±CV	%	2	5.1.4, 5.1.5	Djup	BGCARCV	15
Respirationskvot	-	2	-	Djup	BGRQ	0.9
Bakteriell syrekonsumtion	µmol O ₂ liter ⁻¹ dygn ⁻¹	3	5.1.3	Djup	BGCOXYCO	0.60
Bakt. Syre±CV	%	2	5.1.4, 5.1.5		BGCOXYCV	29

† Tymidinkonversionsfaktor från upptag av tymidin till producerade celler

Statistik anger att grundläggande statistiska funktioner använts.

Q är en kvalitetsfaktor för provet. Se BIOMADs anvisning för kvalitetskoder.

Till huvudvariablerna anges för providentifiering; Utförare, Fartyg, Station (HELCOM BMP-nomenklatur, om definierad), Koordinater, Datum, Klockslag (start inkubering) samt Djup (m).



Värdefulla stödvariabler är bakteriebiomassa, (hela samhället, $\mu\text{mol C liter}^{-1}$), bakterievoly (median, $\mu\text{m}^3 \text{ cell}^{-1}$), syrehalt ($\text{mol O}_2 \text{ liter}^{-1}$), total fosfor (μM), total kväve (μM) och temperatur ($^{\circ}\text{C}$).

Data rapporteras vidare till den svenska nationella marina biologidatabasen BIOMAD vid Inst. f. Systemekologi, Stockholms Universitet, enligt aktuellt kontrakt.

8 Utrustning

Plast- och glasvaror

50 ml rör av polypolypropylene med lock, exv. Falcon, Labora art nr 009-2098.

1.5 ml Eppendorfrör, (polypropylene, exv. Treff Lab, prod. nr 96.7246.5.01) för inkubering.

Plastscintillationsburkar 6 ml, exv. Beckman Mini Poly-Q vial.

Pipettippar 0.5-10 μl och 10-100 μl och 100-1000 μl .

Pasteurpipeter i glas med dragen spets.

Kylcentrifug

En kylcentrifug med kapacitet för 1.5 ml Eppendorfrör, angivet g-tal och helst kylning till 4°C krävs. Exv. kan Beckman GS-15R, rotor F2402 användas (Radiaklab., KBV005). Icke kylcentrifuger kan ställas i kylskåp. Rotorn skall vara kall innan användning.

Vattensug

En vacuumump med kapacitet om minst -400 mmHg krävs. En dragen pasteurpipett kopplas med slang till en vattensug exv. AGA eller Siemens för avlägsnandet av övervåtskan. En sugflaska mellan vattensug och pasteurpipett fångar upp radioaktivt vatten.

Automatpipett

Kalibrerade pipetter som täcker 0.5-10 μl och 10-100 μl och 100-1000 μl behövs. En eldriven pipett kan med fördel användas.

Kylrack

Ett kylrack i plast med plats för 1.5 ml Eppendorfrör förvaras i frys (-20°C). Under upparbetningen håller blocket tillräcklig kyla under c:a 15 min. Förvara blocket i frys när det ej används exv. mellan centrifugeringar.

Kylinkubator

Eppendorf ThermoStat plus (prod nr. 5352 000.010 + 5364 000.016) har speciellt utvärderats för ändamålet och en temperatur om $+2^{\circ}\text{C}$ har funnits ge erforderlig fällningseffektivitet av TCA fällbart material. Skall förkylas 30 min. före användning. Placerad i UMF rum A21 alternativt radiaklab. på KBV005.

Scintillationsräknare

Beckman Coulter™ LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (cat.nr. 510656). Beckmans mjukvara för elektronisk lagring av resultaten från scintillationsräknaren används.

Provrörs omblandare

Vibrofix VF1, Jankel & Kunkel, IKA-Labortechnik.



9 Kemikalier och lösningar

Isotop

Isotop beställs så att så färsk stamlösning som möjligt används. Det skall eftersträvas att stamlösningen ej är äldre än 8 veckor från aktivitetsdatum. Markera ankomstdatum på burken och vilken volym som tagits ut. Se också till att stamlösningen har rätt specifik aktivitet och inte åldras längre än 2 månader. Förvara i kylskåp.

Tritierad [metyl-³H] Tymidin (exv. Amersham beställningsnr. TRK 686) med specifik aktivitet om 80 000 Ci mol⁻¹ och koncentration 12.5 µM (1mCi/ml) används. Den volym som förbrukas per station tas ut provtagningsdagens morgon och sub-volymer från denna för att minimera kontaminering. Använd sterila tappar.

Isotopen är β-strålande och har en räckvidd på c:a 10 mm i vatten. Skydda ansikte och ögon. Använd handskar och skyddsrock. Isotopen kan i utspädd form spolras ut i vasken.

Triklorättiksyra (TCA)

TCA innehåller mycket kristallvatten. 100% (w/v) TCA bereds genom att blanda 500 g TCA (Merck, ProAnalysis) med 227 ml vatten. 5% och 50% TCA bereds från stamlösningen genom spädning med MilliQ vatten.

TCA är mycket frätande på ögon, hud och slemhinnor. Ånga och damm kan irritera och förorsaka lungskada.

Använd skyddsmasker och skyddsrock. Arbeta i dragskåp.

Scintillationsvätska

Toluene- och Xylenfri scintillationsvätska som exv. Pharmacia OptiPhase HiSafe 3, Wallac OY kan användas (prod. nr, 1200-437). Scintillationsvätskan skall kunna blandas med vatten.

Is

Iskross från ismaskin används som kylmedel för TCA rör.



10 Referenser

1. Billen, G., Servais, P. and Becquevort, S. 1990. Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments: bottom-up or top-down control ? *Hydrobiologia* 207, 37-42.
2. Valiela, I. 1984. Marine Ecological Processes. *Springer advanced texts in life sciences*. Springer-Verlag, Berlin, 4, p. 546.
3. Cole, J.J., Findlay, S. and Pace, M.L. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross systems overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 43, 1-10.
4. Fuhrman, J.A. and Azam, F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: Evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66, 109-120.
5. Smith, D.C. and Azam, F. 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using 3H-leucine. *Mar. Microb. Foodwebs* 6, 107-114.
6. Wikner, J. and Hagström, Å. 1999. Bacterioplankton intra-annual variability at various allochthonous loading: Importance of hydrography and competition. *Aquat. Microb. Ecol.* 20, 245-260.
7. Wikner, J., Cuadros, R. and Jansson, M. 1999. Differences in consumption of allochthonous DOC at limnic and estuarine conditions in a watershed. *Aquatic. Microb. Ecol.* 17, 289-299.
8. Bell, R.T. 1993. Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine. In: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, P.F., K., Sher, B.F., Sherr, E.B. and Cole, J.J. (ed.). Lewis Publishers, Boca Raton, p. 495-503.
9. Zweifel, U.L., Norrman, B. and Hagström, Å. 1993. Consumption of dissolved organic carbon by marine bacteria and demand for inorganic nutrients. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 101, 23-32.
10. del Giorgio, P., Cole, J. and Cimleris, A. 1997. Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature* 385, 148-151.
11. Roy, S.O., Packard, T.T., Berdalet, E. and St-Amand, L. 1999. Impact of acetat, pyruvate, and physiological state on respiration and respiratory quotients in *Pseudomonas nautica*. *Aquatic Microb. Ecol.* 17, 105-110.