

Pelagiska bakterier och musselodling

*Pelagic bacteria and mussel culture*

Åke Hagström och Anne-Marie Larsson

## 1 SAMMANFATTNING

I samband med odling av musslor ansamlas stora mängder filtrerande organismer, vilka kan förväntas påverka strukturen och funktionen i det fria vattnet. Som ett led i en undersökning för att bestämma effekten av musselodling gjordes en dygnsstudie av algers och bakteriers primärproduktion. Produktionsdata tillsammans med uppmätta kväve- och fosforfraktioner samt strömförhållanden gav underlag för en jämförelse mellan vatten påverkat respektive opåverkat av en musselodling. I inget fall noterades mätbara skillnader mellan området inuti respektive utanför odlingen under rådande temperatur- och strömförhållanden. Den till algernas primärproduktion nära knutna bakterieproduktionen bestämdes med hjälp av frekvensen delande celler. Låga värden uppmättes och inga tydliga effekter av musselodlingen kunde spåras.

### *Summary*

*The effect of a mussel culture on algal growth, production of exudates and bacterial growth were monitored together with measurements of nitrogen and phosphorous fractions (inorganic and total). Mean water currents of 5-10 cm/s were recorded in the surface water and the water temperature was about 5°C. No changes were found in production of algal and bacteria as a result of the mussels. Neither could gradients in bacterial numbers and inorganic nutrients be detected as a result of the mussel culture.*

## 2 INLEDNING

Förståelsen av pelagiska bakterier som primärproducenter av fosfor- och kväverika föreningar är relativt ny men har kraftigt förstärkts allteftersom nya upptäckter gjorts under de senaste två årtiondena. Sådan information är t ex att frilevande bakterier är metaboliskt aktiva och att bakterier på partiklar utgör en liten del av den totala biomassan (referenser 1,4). Vidare att bakteriers tillväxthastighet i havet, under produktiva förhållanden, medger en till flera fördubblingar per dygn (2, 3, 4). Tillammans innebär detta att det cykliska materialflödet i det fria vattnet (pelagialen) innefattar bakteriers omsättning av organiskt material på samma fundamentala sätt som algernas primärproduktion av kolrika föreningar.

I samband med odling av musslor ansamlas stora mängder filtrerande organismer på ett sådant sätt att det passerande vattnets sammansättning, och därmed pelagialsystemets struktur och funktion, skulle kunna förväntas ändras. Avsikten med denna delstudie var att i fält under ett dygn undersöka effekter av en musselodling på omsättningen av frilevande bakterier. Samtidigt gjordes mätningar av vattnets omsättningshastighet samt av variationer i halter av oorganiska växtnäringsämnen och totalhalter av kväve och fosfor.

Undersökningen har finansierats av Riksbankens Jubileumsfond.

### 3 MATERIAL OCH METODER

#### 3.1 Försöksuppläggning

Vid station "in" markerad med x på kartan (Fig 1) utanför odlingens influensområde mättes C-14 upptag i djupprofiler med 7 djup ner till 10 meter. Bakteriereproduktion mättes vid ett diskret djup (3 m) samt i ett integrerat prov 0-10 m med vatten från varannan meter. I mitten av odlingen vid station "ut" markerad med o på kartan mättes C-14 upptag och bakteriereproduktion vid ett diskret djup (3 m). Samtliga mätningar utfördes vid sex tillfällen under ett dygn i slutet av april 1981. Vid varannat provtagningstillfälle togs även prover för analys av syrgashalt, halter av växt-näringsämnen (nitrat, nitrit, ammonium och fosfat) samt för totalhalter av kväve och fosfor. Under hela försöksdygnet mättes strömmens hastighet och riktning.

#### 3.2 C-14 inkorporering

Upptag av C-14 i mikrobiota och produktion av löst radioaktivt material i form av exudat följdes genom tillsats av radioaktivt natriumvätekarbonat ( $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  10  $\mu\text{Ci}$ ) till flaskor med vatten från respektive djup. Efter inkubering in situ togs prover för bestämning av total inkorporering i helvatten, upptag i partikulärt material storleksfraktionerat genom filtrering (Nucleopore, Shandon corp.), samt löst extracellulärt material i form av filtratet efter 0,2  $\mu$  filtrering. Filtren placerades i scintilla-

tionsflaskor och surgjordes med några droppar saltsyra (0,1 M HCl). Efter torkning tillsattes scintillationsvätska (OSC, New England) och filtren räknades i scintillationsräknare (Nuclear, Chicago). Vattenprover surgjordes (1,0 M HCl, pH 2) varefter kvarvarande  $^{14}\text{CO}_2$  strippades bort genom luftbubbling (10 min), scintillationsvätska (Instagel, Packard Instruments) tillsattes och proverna räknades (6, 7).

### 3.3 Bakterieproduktion

Totalantal bakterier bestämdes genom direkträkning i epifluorescensmikroskop. Fyra replikat (5 ml) togs från varje vattenprov och sattes till skruvlocksror med 0,4 ml buffrad (hexamethylenediamine, 20 g/100 ml pH 7.2) formaldehyd (20 % wt/wt) innehållande ethidiumbromid (8 mg/100 ml). Efter filtrering (0,2  $\mu$  Nuclepore) monterades filtret i kanelaldehyd och nejlikolja (1,2). Filtren räknades under en total förstoring av 984 ggr. Tio fält eller minst 300 bakterier räknades på varje filter. Delande bakterier räknades på minst 10 fält, om färre än 30 delande celler återfanns räknades maximalt ytterligare 20 fält. Bakterie med synlig invagineringsring, men utan en klar zon mellan dotterceller betraktades som en delande cell (3, 7).

### 3.4 Ljusförhållanden

Fördelning i djupled av kvanta i våglängdsområdet 400-700 nm mättes med ett integrerande instrument (Li Cor).

### 3.5 Ström, salinitet och temperatur

Strömmens hastighet och riktning bestämdes med hjälp av tre s k Gyttremätare vid varje provtagningsstation på 3, 6 och 10 meters djup. Mätarna registrerar elektroniskt strömhastighet och strömriktning varje timma. Mätperioden är 50 sekunder. Salinitet bestämdes med laboratoriesalinometer. Temperaturen mättes med en termistor fastsatt på en mätare för horisontell ljustransmission (665 nm).

### 3.6 Syrgas, växtnäringsämnen, totalt kväve och fosfor

Syrgashalten bestämdes genom Winklers titrimetriska metod (9). Analyser för växtnäringsämnen (nitrit, nitrat, ammonium och fosfat) utfördes i överensstämmelse med "New Baltic Manual" (1972) (9). För reduktion av nitrat användes kadmiumamalgam med 25%-ig ammoniumklorid som buffert. Vid ammoniumanalys användes den modifierade reagensen Trion och buffert istället för hypokloritlösning. Analys av totalhalter kväve och fosfor utfördes på samma prov. Provet oxiderades med en lösning av kaliumperoxodisulfat, borsyra och natriumhydroxid vid ca 110°C i en trykkokare (10). Samtliga analyser gjordes på 25 ml prov.

## 4 RESULTAT OCH DISKUSSION

Effekten av en musselodling på två för energiflödet i pelagialsystemet betydelsefulla komponenter undersöktes genom att jämföra algers och bakteriers primärproduktion vid två stationer i intervall under ett dygn.

Vattnets densitetsskiktning samt strömmens medelhastighet och huvudriktning för stationen utanför odlingarna vid tre provtagningstillfällen visas i figur 2a och 2b. Densitetssprångskiktet var väl utvecklat under dagen (kl 05 och kl 12) på djup mellan 1 och 4 meter. På kvällen (kl 19) har blandningen ökat och densiteten ökar nu kontinuerligt med djupet. Temperaturen varierar från ca 7°C i ytan till ca 4°C på 10 meters djup. Saliniteten varierar från ca 28 o/oo i ytan till 32,4 o/oo på 10 meter. Strömmens hastighet och riktning är mycket varierande under dygnet. Hastigheten varierar från 0 till 12 cm/s på 3 meters djup utanför odlingen. Riktningen på samma mätare domineras antingen av strömmar in genom sundet (mot V) eller av strömmar ut genom sundet (mot NV). Figur 2a visar en medelbild av strömmarna under provtagningsdygnet. Klockan 05 råder utström från ytan till bottnen. Mellan klockan 06 och 10 vänder strömmen på alla djup för att sedan under dygnet huvudsakligen vara riktade in genom sundet. Denna inströmning avbryts av en kort utströmningsperiod mellan klockan 16 och 18. Vattnets typiska medelhastigheter är 5-10 cm/s i ytan och 1-5 cm/s under språngskiktet. Inom odlingsområdet är strömhastigheten lägre på alla djup eller 0-2 cm/s i ytan och 0-1 cm/s under språngskiktet. Det innebär att det tar minst 5 timmar för vattnet att passera genom odlingarna.

Primärproduktionens relativa storlek under dygnet ges i figur 3 tillsammans med det infallande ljuset som nära följer produktionskurvan. Koncentrationen av oorganiska växtnäringsämnen ( $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$ ) visar endast små förändringar under dygnet. De relativt höga absoluta mängderna av tillgängligt kväve och fosfor tycks därför inte utgöra begränsande faktorer för produktionen av algbiomassa (Fig 4a och 4b).

Fördelningen av och variationerna i halter av de oorganiska växt-näringsämnen följder variationer i salinitet och bestäms istället av fysikaliska processer som strömmar och omblandning (fig 2 och 6). Vatten med låg salinitet har låga halter oorganiska växt-näringsämnen.

Algernas utsöndring av extracellulärt löst material illustreras i figur 3. Den uppmätta mängden radioaktivt märkt exudat representerar endast delvis det totala flödet av löst organiskt material med ursprung från levande alger. På grund av kort omsättningstid för detta material (6), bestäms storleken av skillnaden mellan den av algerna producerade mängden och bakteriernas konsumtion. Larsson & Hagström (7) har visat att upptaget i bakterier står i jämvikt med exudatproduktionen inom en timme.

Storleksfördelningen av den fotosyntetiskt aktiva algpopulationen framgår av figur 5 där  $^{14}\text{C}$ -upptaget i olika storleksklasser redovisas.

Maximum i  $^{14}\text{C}$ -upptaget på 5-7 meters djup följs av ett maximum i totalhalterna av kväve och fosfor (fig 6).

Totalhalternas värden för både kväve och fosfor är genomgående lägre inom odlingsområdet jämfört med stationen utanför (möjligen undantaget kvävehalterna kl 16). Hos de oorganiska växtnäringsämnen finns ingen motsvarande skillnad. Skillnaden i totalhalter torde vara den del som musslorna konsumerar. Vid undersökningstillfället pågick en algblomning dominerad av *Chaetoceros decipiens* men även bioluminescerande dinoflagellater var talrika. Följaktligen dominerar produktionen av alger  $> 10 \mu\text{m}$ .



Genom att jämföra vatten utanför odlingen med vatten inne i odlingen, inkuberat vid ett diskret djup, kan musselodlingens effekter på algproduktionen illustreras (Fig. 7). Olyckligtvis försvåras jämförelsen mellan de båda stationerna av det kraftiga produktions-maximat mellan 5 och 7 meter. Små avvikelser i djupled vid provtagningen kan ge stora variationer på grund av de kraftiga koncentrationsskillnaderna. De erhållna skillnaderna är därför inte tillräckligt stora för att förklaras annat än som provtagningsvariationer trots något lägre värden vid stationen inne i odlingen under den produktiva delen av dagen. Det bör understrykas, att produktionen inte har normerats till antalet algceller, varför t ex högre produktion per cell i odlingen inte kan uteslutas. Minskningarna i halterna av organiskt kväve och fosfor inne i odlingen är procentuellt små varför cellmassorna torde vara ungefär jämförbara.

Även bakterieproduktionen tycks reagera måttligt inför det partikelfilter som musselodlingen utgör. Antalet bakterier påverkas inte nämnvärt vid de båda stationerna (Fig 8a), möjligen kan en viss tendens av något lägre värden inne i odlingen spåras. Denna tendens understryks av en separat mätning klockan 16 i ett tvärsnitt genom odlingen med sex provpunkter. Medelvärdet i odlingen var  $1,9 \pm 0,1 (10^6)$  bakterier per ml jämfört med  $2,5 \pm 0,4 (10^6)$  bakterier per ml utanför odlingen, dock kunde ingen gradient observeras. Inte heller kunde några gradienter i halter av oorganiska näringsämnen eller totalkväve och totalfosfor observeras. Vattenomsättningen i odlingen under provtagningsperioden var mycket liten på alla djup. Om odlingen orsakade mätbara gradienter under rådande förhållanden skulle detta således visat sig.

Produktionen av bakterier beror av den existerande biomassan samt dess tillväxthastighet. Frekvensen delande celler (FDC) är direkt relaterad till bakteriepopulationens tillväxthastighet (3, 7). Genom att bestämma bakteriepopulationens FDC (Fig 8b), och översätta detta värde med hjälp av ett kalibrerat temperaturberoende förhållande mellan FDC och tillväxt av bakterier, kan populationens medeltillväxthastighet beräknas. I tidigare arbeten av Hagström et al (3) och Hagström och Larsson (4) redovisas omräkningsfaktorer för respektive temperaturintervall. Medelgenerationstiden vid båda stationerna var ca 70 tim d v s bakterierna delar sig var tredje dag.

Den med fotosyntesen synkroniserade ökningen i bakterieaktiviteten under dygnet innebär troligen att en viss del av populationen varje dag kommer till slutet av cellcykeln och börjar dela sig med ett synbart septa (cellvägg) mellan dottercellerna som följd. Utöver denna aktivitet pågår en långsam tillväxt som medför att viss celledelning alltid kan registreras. Bakterieproduktionen i och utom musselodlingen kan beräknas genom att medelgenerationstiden multipliceras med abundansen och medelcellvolymen ( $0,14 \mu\text{m}^3$ ) (8). Den producerade mängden bakterier både inne i och utanför musselodlingen är ca  $7 \times 10^8$  bakterier per liter. Detta motsvarar en våtvikt av ca  $14 \text{ mg C/m}^3$ .

I den jämförelse av bakterieomsättningen i in- och utflödet till odlingen som visas i figur 8b har endast % FDC angivits eftersom temperatur och abundans inte förändras nämnvärt under dygnet. Detta innebär att FDC direkt avspeglar variationen i produktionen. FDC-kurvan är mer utslätad inne i odlingen, vilket innebär att bakterierna här växer något långsammare under längre tid.

Totalt betyder detta ändå att dygnsproduktionen blir ungefär lika för båda stationerna. Medeltemperaturen i vattenpelaren (0-10 m) var 5,4-5,7 °C med det högsta värdet på eftermiddagen. Den låga vattentemperaturen medför låg bakterietillväxt (4), varför musselpopulationen har liten glädje av att utnyttja bakterier som föda. En viss andel bakterier konsumeras ändå under det att musslorna filtrerar vatten för att få tag i större partiklar. Detta medför något lägre bakterieantal i odlingsområdet.

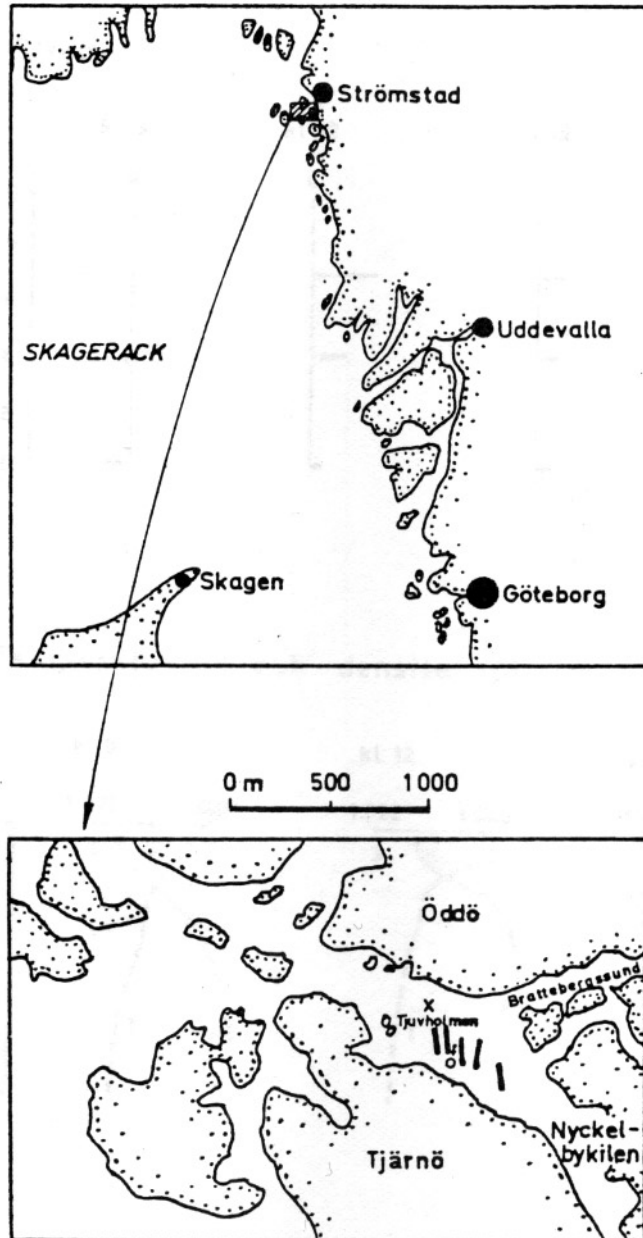
## 5 SLUTSATS

Musselodlingen betraktad som filter och katalysator för mineralisering förmår vid för studien gällande temperatur- och strömförhållanden inte påverka primärproduktionens storlek och sammansättning. Produktionen av bakterier var vid mättillfället låg, men förändrades ej mätbart i musselodlingen jämfört med området utanför.

6 REFERENSER

- (1) Azam, F. and R.E. Hodson: Size distribution and activity of marine microheterotrophs. *Limnol. Oceanogr.* 22(3), 492-501 (1977).
- (2) Fuhrman, J.A. and F. Azam: Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. *Appl. and Environ. Microbiol.* 39(6), 1085-1095 (1980).
- (3) Hagström, Å., U. Larsson, P. Hörstedt and S. Normark: Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in Aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 37(5), 805-812 (1979).
- (4) Hagström, Å. and U. Larsson: Diel and seasonal variation in growth rates of pelagic bacteria, in: *Heterotrophic activity in the sea*. Ed Hobbie, J. and P.J. le B. Williams (in press).
- (5) Hoppe, H.-G.: Determination and properties of actively metabolizing heterotrophic bacteria in the sea, investigated by means of micro-autoradiography. *Mar. Biol.* 36, 291-302 (1976).

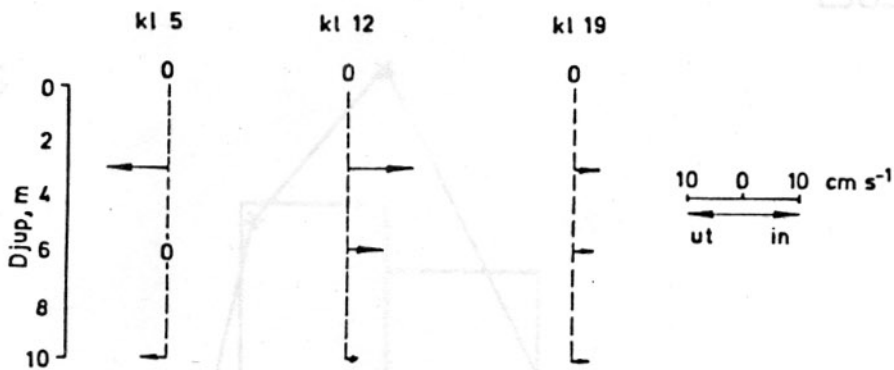
- (6) Hoppe, H.-G.: Relations between active bacteria and heterotrophic potential in the sea. Netherl. J. Sea Res. 12(1), 78-98 (1978).
- (7) Larsson, U. and Å. Hagström: Phytoplankton exudate release as an energy source for the growth of pelagic bacteria. Mar. Biol. 52, 199-206 (1979).
- (8) Larsson, U. and Å. Hagström: Fractionated Phytoplankton primary production, exudate release, and bacterial production in a baltic eutrophication gradient. Marine Biology (in press).
- (9) Carlberg S.R.: New Baltic Manual. Coop. Res. Report Series A, No 29, ICES 1972.
- (10) Valderrama J.C.: The simultaneous Analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. Mar. Chem. 10, 109-122 (1981).



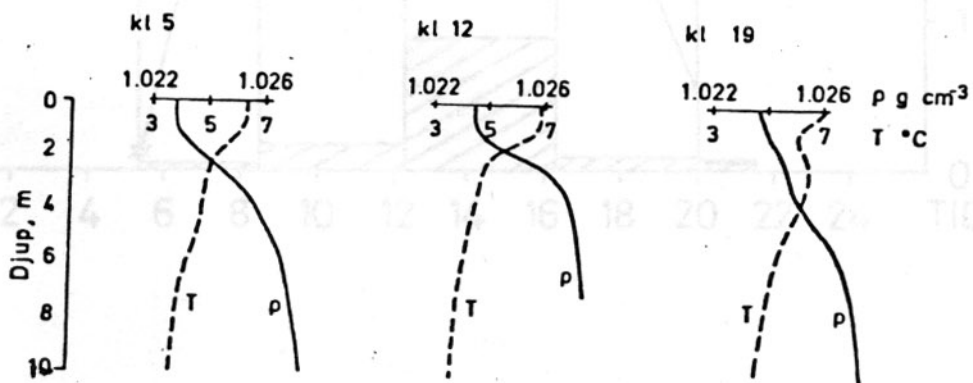
Figur 1. Karta över provtagningsstationerna.  
 X - belägen utanför odlingsområdet.  
 o - belägen mitt i odlingsområdet.

Fig 1 Map of sampling area. (x) outside and (o) inside the musselfarm.

## Ström



## Temperatur (T) och densitet ( $\rho$ )

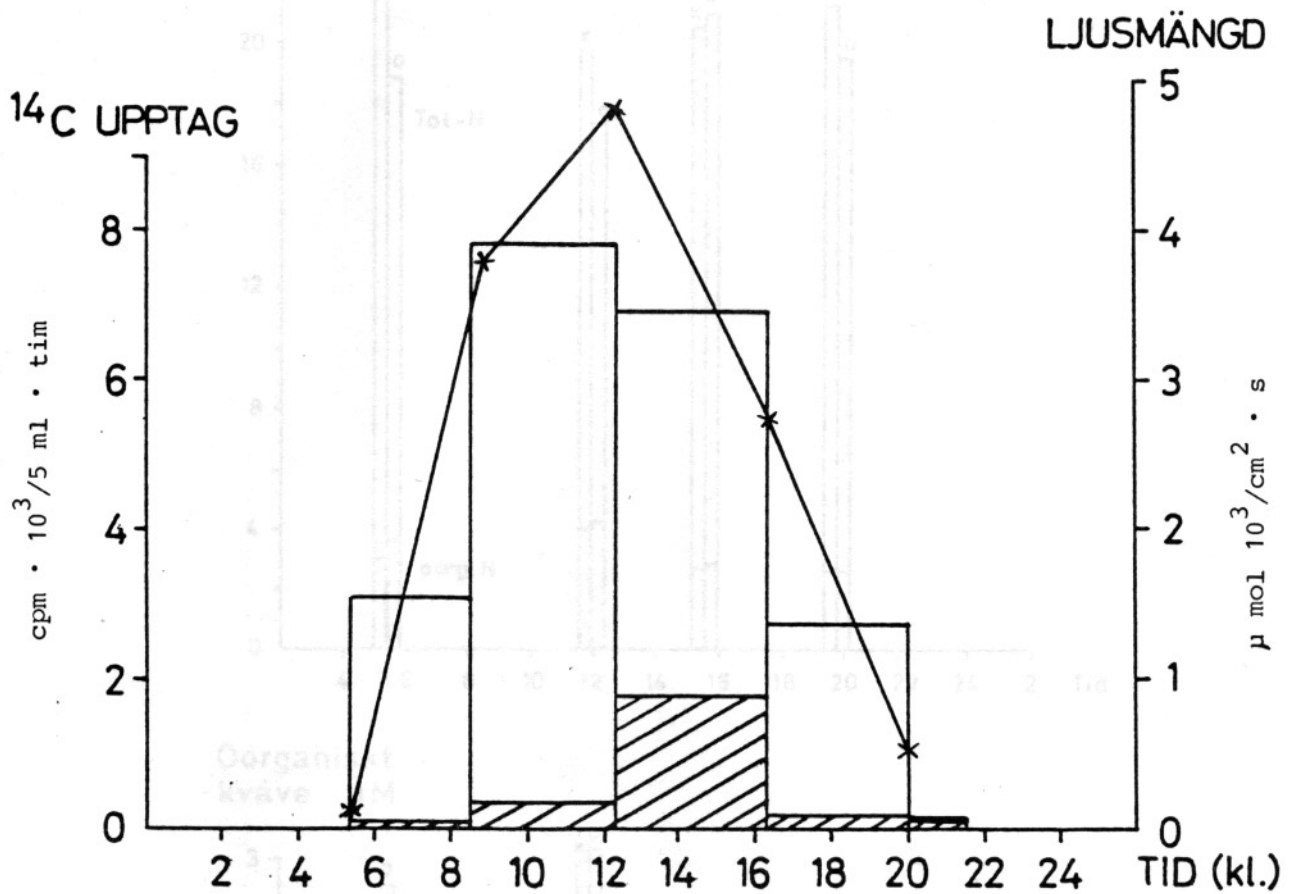


Figur 2a. Strömmens medelhastighet och huvudriktning på 3, 6 och 10 meters djup utanför odlingen vid provtagningstillfällena.

Figur 2b. Temperatur- och densitetsfördelning vid stationen utanför odlingen.

Fig 2a Mean watercurrent velocity and main direction at 3, 6 and 10 meters depth outside the mussel farm at five, twelve and nineteen o'clock.

2b Temperature and density distribution outside the mussel farm.

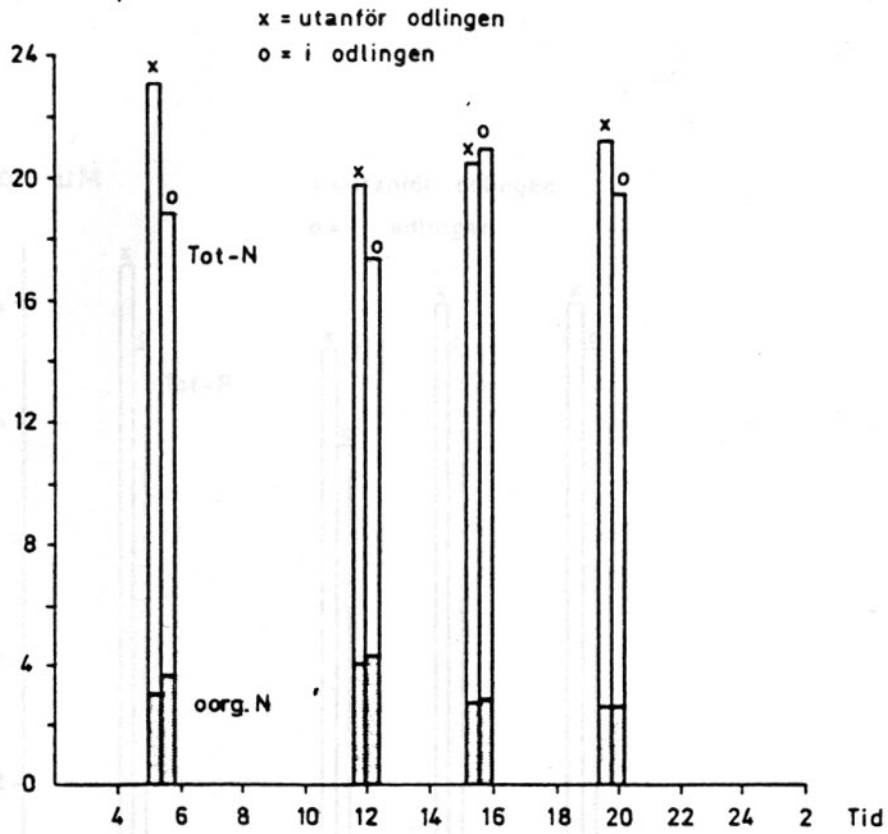


Figur 3. Primärproduktionens relativa storlek 28/4 - 29/4 1981. <sup>14</sup>C-inkorporering (staplar) i helvatten och exudat (streckad). Integrerade värden 0-10 m. Den integrerade ljusmängden (400 - 700 nm) i vattenpelaren (0 - 10 m) anges med (-X-).

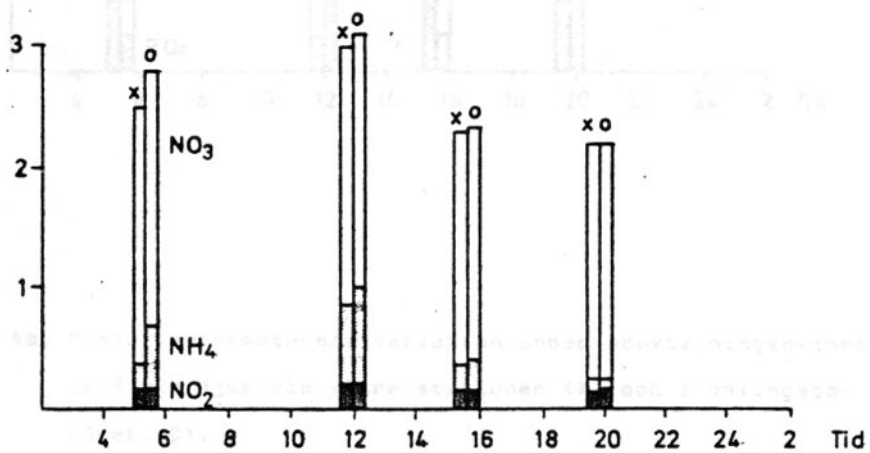
Fig 3 The relative size of algal primary production (28/4-29/4 1981) <sup>14</sup>C assimilation in unfractionated water and exudate (hatched). Bars represent integrated values (0-10 m). Inflowing light (400-700 nm) integrated 0-10 m is given in graph (-x-).



Kväve  $\mu\text{M}$

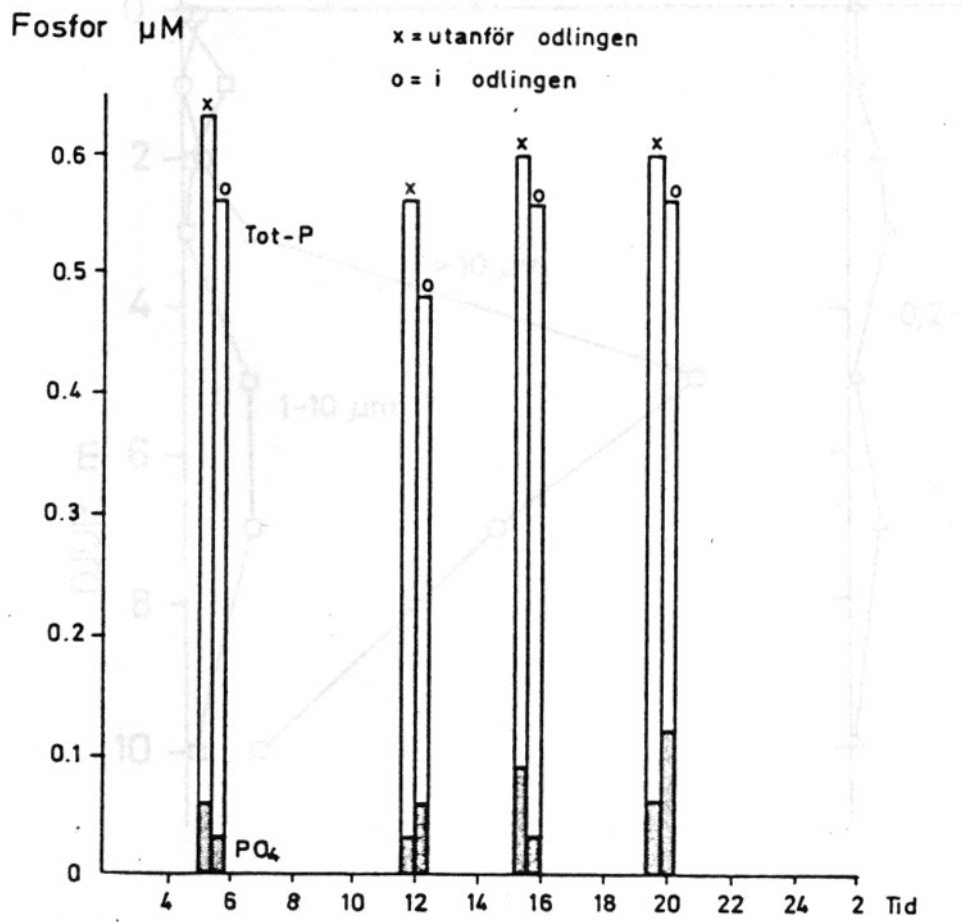


Oorganiskt kväve  $\mu\text{M}$



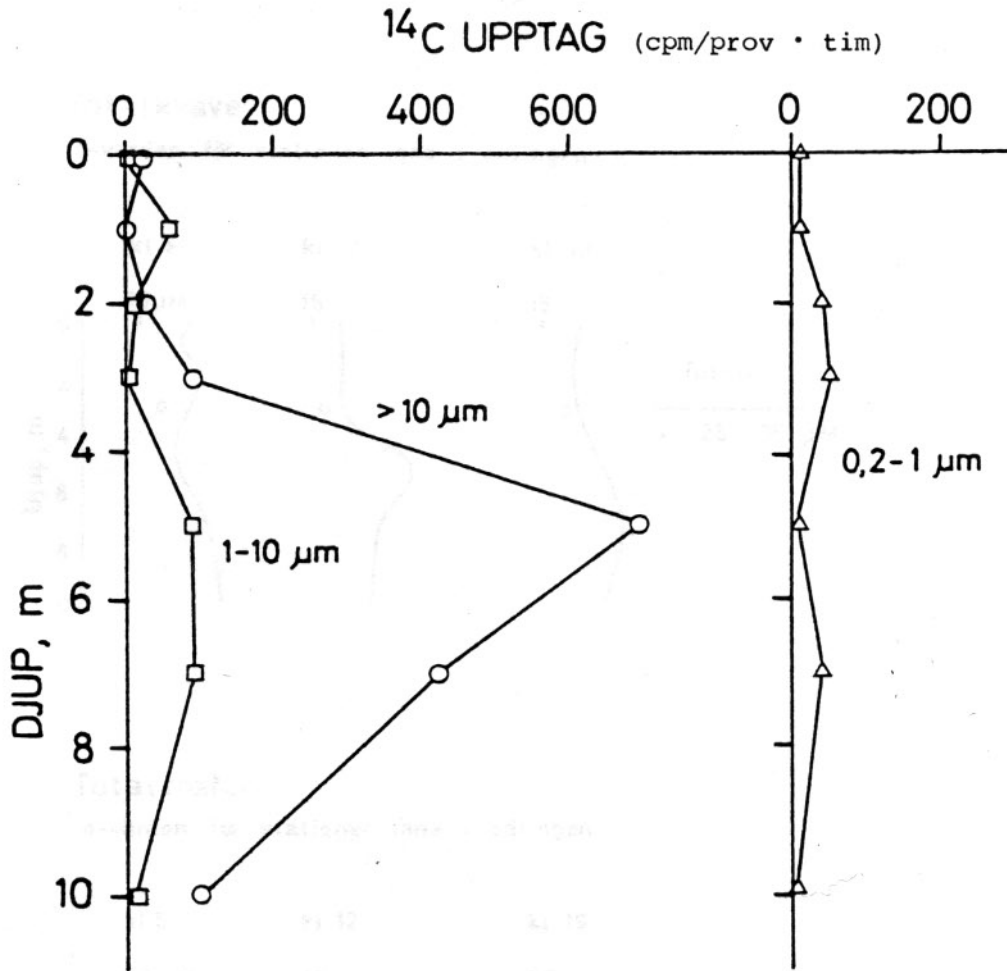
Figur 4a. Kvävekomponenternas variation under provtagningsdygnet på 3 m:s djup vid yttre stationen (x) och i odlingen (o).

Fig 4a Variations in different nitrogen components at 3m depth during the sampling time, (-x-) outside and (-o-) inside the musselfarm.



Figur 4b. Fosfor-komponenternas variation under provtagningsdygnet på 3 m:s djup vid yttre stationen (X) och i odlingsområdet (O). (år 1985 11.12.23-12.25.)

4b Same as 4a for phosphorus components. (year 1985)

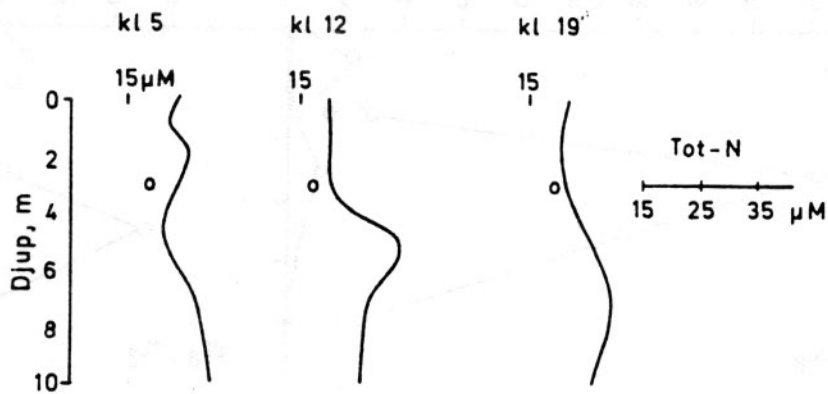


Figur 5.  $^{14}\text{C}$ -upptag i olika storleksfraktioner och stationen utanför odlingen kl 12.20-16.25.

Fig 5  $^{14}\text{C}$  uptake versus depths in different size-fractions incubated at noon outside the musselfarm.

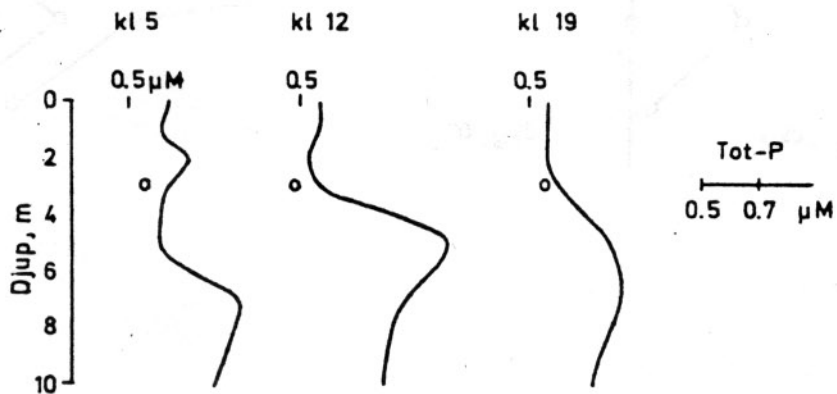
## Totalkväve

o-värden för stationen inne i odlingen



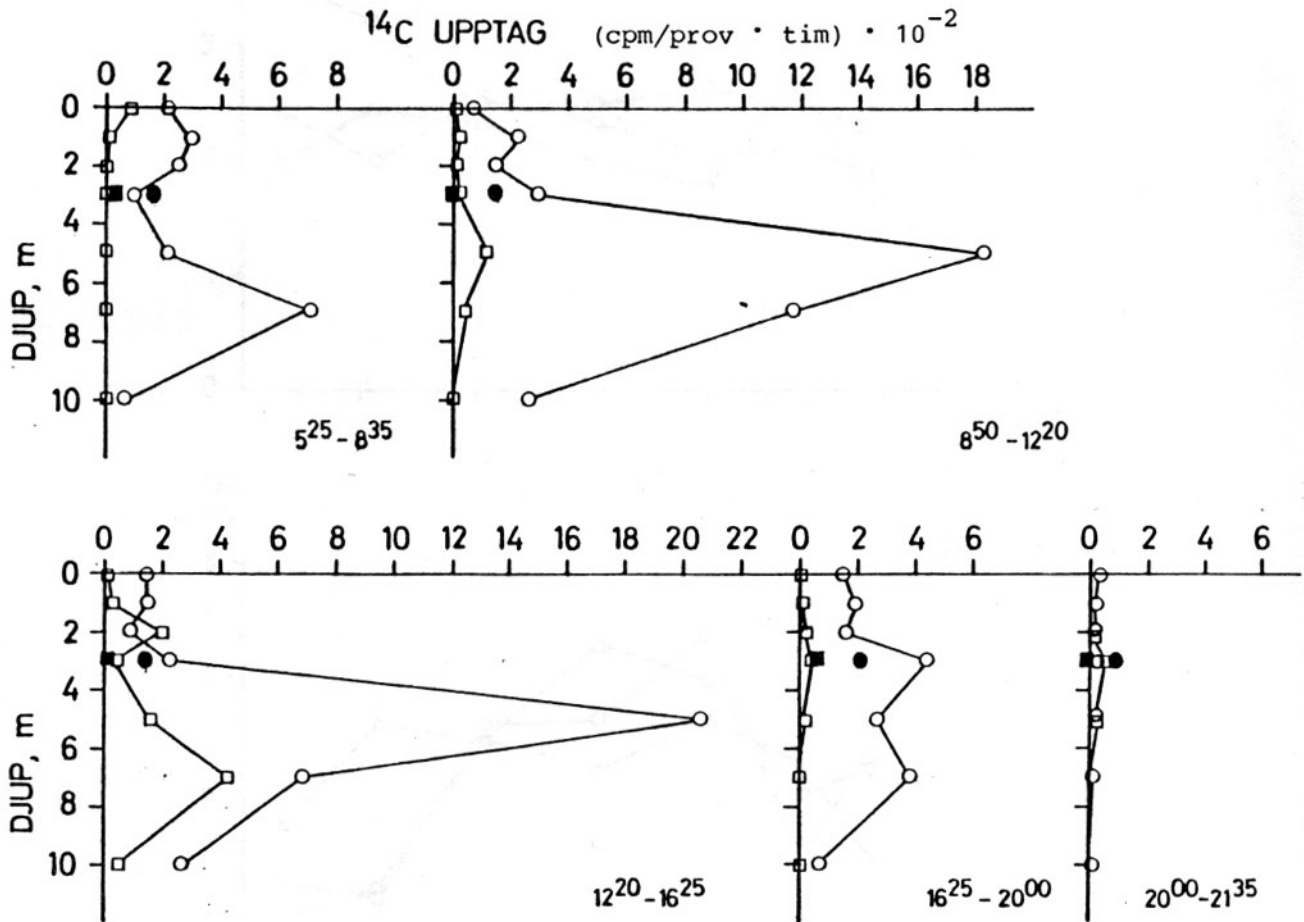
## Total fosfor

o-värden för stationen inne i odlingen



Figur 6. Vertikalprofiler för totalhalter av kväve och fosfor vid stationen utanför odlingen. Motsvarande värden på 3 m:s djup inne i odlingen anges (o).

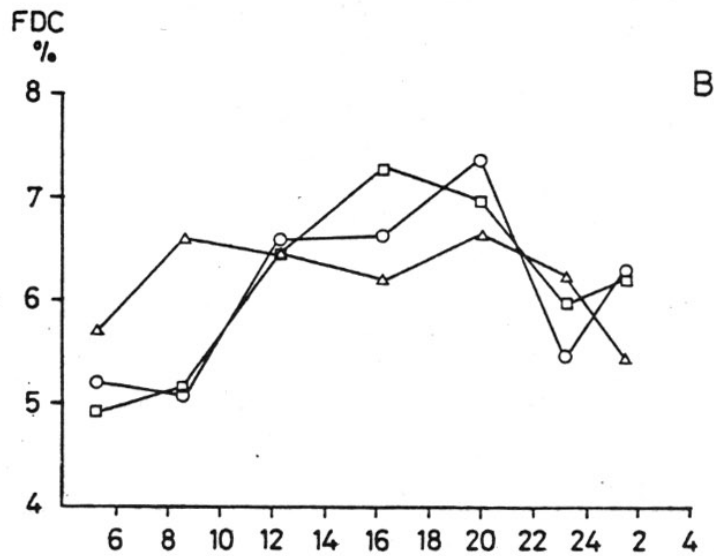
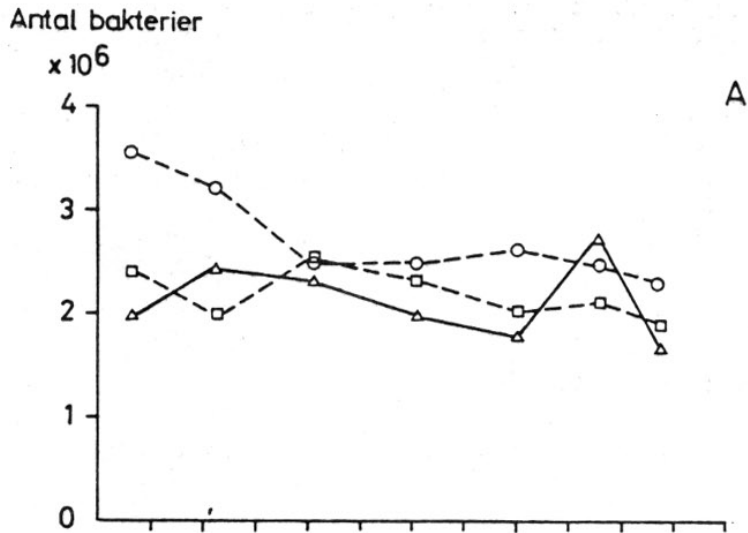
Fig 6 Vertical profiles of total amounts of nitrogen and phosphorous in the water outside the mussel farm. Corresponding values on 3 meters depth inside the farm are shown (o).



Figur 7.  $^{14}\text{C}$ -upptaget i djupprofiler (cpm/tim·prov (5 ml)  $\times 10^2$ ) i helvatten (-o-) och exudat (-□-) från stationen utanför odlingen.

Medelvärde för två prover från 3 m vid stationen inne i odlingen anges med (-●-) i helvatten och med (-■-) i exudat.

Fig 7  $^{14}\text{C}$  uptake in depth profiles (cpm · hour<sup>-1</sup> ·  $10^2$ ) (sample volume 5 ml), (-o-) unfractionated water and (-□-) exudates from outside the musselfarm. Mean values for double-samples incubated at 3 m inside the musselfarm are shown with filled circles and squares respectively.



Figur 8a. Antal bakterier per ml vid direkträkning.

Figur 8b. Frekvens delande celler hos bakteriepopulation

-o- representerar integrerat prov från 0-10 m vid stationen utanför odlingen.

-□- representerar diskreta prover från 3 m djup vid stationen utanför odlingen.

-△- representerar diskreta prover från 3 m djup vid stationen inne i odlingen.

Fig 8a Number of bacteria obtained from direct counts in epifluorescence microscope.

8b Frequency of dividing cells (FDC)

-o- outside mussel farm integrated samples (0-10 m)

-□- outside mussel farm discrete samples (3m)

-△- inside mussel farm discrete samples (3m)