

Programområde: **Kust och Hav**

Undersökningstyp: **Pelagiala bakterier**

### Mål och syfte med undersökningstypen

Syftet med att mäta förekomst och produktion av pelagiala bakterier (gruppen heterotrofa) i havsvatten är främst att upptäcka onaturlig gödning av havsmiljön. Metoden ger ett mått på den biologiska syreförbrukningen *in situ* (jmf. biologisk syreförbrukning, BOD<sub>7</sub>). Undersökningstypen kan användas både lokalt i recipienter och i stor skala (Östersjöns delbassänger). Bakterievvariablerna kan också bidra till övervakning av klimatförändringar och UV-instrålning. Miljögifter, främst tungmetaller, förväntas påverka bakterievvariablerna negativt.

Målet är att upptäcka skillnader och förändringar i bakterieproduktion, stående bakteriebiomassa och dess omsättningshastighet (produktion/biomassa, P/B-kvot). Dessutom är ambitionen att skilja klimatologiskt eller andra naturligt betingade variationer från antropogena.

### Att tänka på

Bakteriernas korta generations tid (1-6 dagar sommartid) gör att de speglar vattenmassan där de befinner sig, så länge dess omsättningstid är längre. En kustbassäng med 1 km<sup>3</sup> vattenvolym och i medeltal 10 d omsättningstid skiljer sig tydligt från motsvarande utsjöområde avseende absoluta värden för pelagiala variabler. Den korta generationstiden gör att bakterievvariablerna potentiellt kan reagera på miljöstörningar även inom år. De bör övervägas för program med sk. "tidig-varning" ambitioner, då både analys av prover och rapportering i princip kan utföras samma dag.

I öppna utsjöområden är den tidsmässiga variationen i bakterievvariablerna klart högre än de rumsliga<sup>1</sup>. För val av mätstation i kustområden bör främst indelningen i typområden beaktas. Kunskap om lokala strömförhållanden eller medeltemperatur kartor är också av värde för om en eller flera mätpunkter bör läggas ut för att beskriva en lokal. Sötvattenplymer och speciellt turbulenta vattenområden (eg. betingat av strömmar och bottentopografi) bör undvikas om inte syftet är att mäta just dessa. Kustpåverkan av näringsförhållandena i stort kan variera mellan 0 och 10-tals kilometer beroende på om det är öppen kust eller skärgårdsområde<sup>2</sup>.

Prover för bakteriebiomassa konserveras direkt i glasflaskor. Analys utförs vid ett kvalificerat. Prov för bestämning av bakterieproduktionen tas i 2 x 3 replikat och upparbetning måste delvis ske i direkt anslutning till provtagning. Arbete med och analys av radioisotoper måste kunna utföras.

Undersökningen samordnas lämpligen med annan pelagialövervakning avseende biologi och kemi. Temperatur är en viktig förklaringsvariabel, liksom fosfat och oorganiskt kväve och bakterieätande flagellater. Ytterligare förklaringsvariabler av betydelse kan tillföras efter utvärdering av pågående mätserier.

## Strategi

Bakterieproduktionen är i grova drag proportionell mot respirationen (eg. biologisk syreförbrukning) och därmed den organiska produktionen i systemet. Produktionen av bakterieplankton påverkas direkt av halt och sammansättning av organiskt material och närsalter i vattenpelaren vid temperaturer över c:a 5 °C<sup>3-5</sup>. I pelagialen sker 80-90% av sekundärproduktionen i havet och bakterieplankton står för 40-50% (Bottniska viken). Detta innebär att bakterieplanktons syreupptag utgör en stor del av den biologiska syreförbrukningen i systemet och indirekt ger ett mått på den totala respirationen av organiskt material (sekundärproduktionen). Detta kan liknas vid en *in situ* bestämning av biologiskt syrekra (eg. BOD<sub>0</sub>). Härvid antas bl.a. att mellanårsvariationen i andelen bakteriell respiration av den totala respirationen är försumbar (årsbasis), liksom bakteriesamhällets genomsnittliga tillväxteffektivitet.

En positiv korrelation mellan näringsstatus och bakterievariablerna har visats<sup>3</sup>. Ökad produktion av organiskt material genom ökad växtplankton produktion och/eller tillförsel av älvburet löst organiskt material förväntas därmed resultera i en högre produktion och en högre biomassa av bakterier. Likaså kan en direkt gödning av bakteriesamhället via begränsande närsalt (främst kväve eller fosfor) förväntas. Temperatur verkar direkt begränsande endast under 5°C. Betning av små encelliga djurplankton påverkar också bakteriebiomassan, men konkurrens inom bakteriesamhället verkar huvudsakligen vara reglerande faktor.

Undersökningstypen skall främst svara mot hotbilden övergödning i kustvatten såväl som utsjöområden. Förändrad UV-instrålning<sup>6</sup> och klimat (främst temperatur) förväntas också orsaka förändring hos bakterievariablerna. Även vissa miljögifter med verkan på fundamentala cellprocesser (exv. Hg, Cd, Cu, Ni och Zn) förväntas påverka bakterievariablerna initialt<sup>7</sup>. Genetisk anpassning hos bakteriesamhället kan dock dölja belastning av tungmetaller redan inom några generationer.

## Statistiska aspekter

Den rumsliga (horisontella) variationen hos bakterievariablerna är mindre än den tidsmässiga<sup>1</sup>. I grunda områden <25 m är även den vertikala variationen relativt liten. Få stationer med hög tidsupplösning anses idag ge bästa skattning av årsmedelvärden för ett område. För att bedöma påverkansområden i exv. recipienter kan dock annan typ av uppläggning med större

rumslig spridning av provtagningspunkter och enstaka djup vara fördelaktigare. Generellt sett måste uppläggnings anpassas till frågeställningen.

Baserat på högfrekvent provtagning (18 ggr per år) har styrkan (eg. sannolikheten att upptäcka en trend,  $1-\beta$ ) för bakteriebiomassa beräknats till  $5\% \text{ år}^{-1}$  med 80% sannolikhet för en 11 års mätserie<sup>8</sup>. Motsvarande för bakterieproduktionen är  $12\% \text{ år}^{-1}$  ( $1-\beta=0.80$ ) för en 10 års mätserie. Vilken förändring per år som kan anses motsvara signal om förhöjd produktion är ej fastlagt. Styrkan hos bakteriebiomassevariabeln är nära jämförbar med den för närsalter.

För längre mätserier tillämpas lämpligen ett icke-parametriskt säsongsbaserad trendanalys av typen Mann-Kendall (HELCOM rekommendation)<sup>9, 10</sup>. För intensivstationer där tillräcklig täckning av säsongsvariationen finns (c:a 18 provtagningar per år) kan årsproduktioner användas och parametrisk linjär regression enligt modell I tillämpas. Senaste årets mätresultat kan också jämföras med 95% konfidensintervallet för hela föregående mätperiod.

Mätvärden för bakteriebiomassa är ofta normalfördelad. Bakterieproduktion och P/B-kvot kan vanligen logaritm-transformeras till en approximativ normalfördelning. Därmed kan parametriska variansanalyser (ANOVA) med efterföljande post-hoc tester tillämpas för att visa skillnader mellan lokaler och tidsperioder. I de fall där normalfördelning ej kan uppnås rekommenderas icke-parametriska test av typen Mann-Whitney U-test eller Wilcoxon signed rank-test<sup>11</sup>. Minst tre års mätningar (för en given månad eller helt år) behövs för att kunna ta hänsyn till naturlig variation vid test av skillnad mot ett referensområde. En bedömning av om visad skillnad beror av antropogen påverkan bör ändå göras bl.a. genom jämförelse med andra undersökningstyper, klimatologiska förändringar och förekomst av industriell eller kommunal aktivitet. Anledningen är att undersökningstypen p.g.a. sin styrka kan tänkas upptäcka naturliga skillnader även inom typområden.

## **Mätprogram**

### ***Variabler och tidsperioder***

Bakterieproduktion och bakteriebiomassa mäts för hela bakteriesamhället. Den beräknade kvoten mellan produktion och biomassa blir därmed en approximation för medeltillväxthastigheten per cell. Som extra information ger bildanalysen morfologiska grupper för bakteriesamhället. Metoder för rutinmässig övervakning på artnivå saknas.

Vattentemperatur är en viktig förklaringsvariabel under den kallare delen av året (Tabell 1). Kunskap om förekomsten av flagellater som är bakterieätande kan bidra till tolkningen av förändringar i bakteriebiomassan. Halten av löst organiskt kol är kopplat till bakterieplanktonens substrattillgång. Kunskap om fosfathalten och halten av oorganiskt kväve är också värdefullt som förklaringsvariabler till förändringar i bakterievariablerna.

Säkrast uppskattning av bakterieproduktionen och biomassa erhålls om båda variablerna mäts högfrekvent med två veckors intervall under den produktiva säsongen. Kringvariablerna temperatur och heterotrofa flagellater ger möjlighet att särskilja temperatur och betningseffekter på variationen i bakterievariablerna. Detta kan minska mellanårsvariationen och därmed öka styrkan hos huvudvariablerna. Försiktighet bör dock visas vid nyttjande av förklaringsvariabler som i sig själv kan påverkas av huvudvariabeln, som t.ex. halten av

heterotrofa flagellater. Förklaringsvariabeln kan exv. också ta bort trender hos huvudvariabeln p.g.a. interaktionen dem emellan.

Provtagning enskilda månader med låg mellanårsvariation kan ge uppfattning om nivån på bakterievariablerna jämfört med en referensstation. Augusti är preliminärt en god förhandskandidat till en representativ månad. Minst två provtagningar per månad bör genomföras. Värdet av kringvariablerna minskar dock vid denna typ av provtagning, eftersom de inte är direkt korrelerade med huvudvariablerna inom år.

Tabell 1. Huvudvariabler och kringvariabler i undersökningstypen högfrekvent övervakning av pelagiala bakterier. Preliminär provtagningsfrekvens anges.

Företeelse	Determinand	Fraktion	Enhet	Prioritet	Frekvens och tidpunkter	Referens till metodprotokoll
Vattenmassa	Bakterieproduktion	Hela samhället, cellantal	celler m <sup>-2</sup> dag <sup>-1</sup>	2	18 ggr år <sup>-1</sup> alt. Aug.	Bilaga 1
Vattenmassa	Bakterieproduktion	Hela samhället, biomassa	µmol C m <sup>-2</sup> dag <sup>-1</sup>	2	18 ggr år <sup>-1</sup> alt. Aug.	Bilaga 1
Vattenmassa	Bakterieantal	Hela samhället	celler m <sup>-2</sup>	1	18 ggr år <sup>-1</sup> alt. Aug.	Bilaga 2
Vattenmassa	Bakteriebiomassa	Hela samhället	µmol C m <sup>-2</sup>	1	18 ggr år <sup>-1</sup> alt. Aug.	Bilaga 2
Vattenmassa	Bakterieantal	Morfologityper	celler m <sup>-2</sup>	3	18 ggr år <sup>-1</sup> alt. Aug.	Bilaga 2
Vattenmassa	Temperatur	-	°C	1	18 ggr år <sup>-1</sup> alt. Aug.	Termomet er el. CTD
Vattenmassa	Flagellater	Heterotr. 1-5 µm	µmol C/m <sup>2</sup>	3	18 ggr år <sup>-1</sup> alt. Aug.	Se växtpl.
Vattenmassa	Löst organiskt kol	Alla kolföreningar	µmil liter <sup>-1</sup>	3	18 ggr år <sup>-1</sup> alt. Aug.	Bilaga 3

## Metoder

Mätning av bakterieproduktion utförs enligt upptag av basanologen tymidin enligt HELCOM's riktlinjer (se också <sup>12</sup> och referenser däri). Metoden har modifierats för enklare och billigare analys enligt metodprotokoll i bilaga 1 (jmf. <sup>13</sup>).

Uppskattning av bakteriebiomassa görs genom märkning med färgämnet acridinorange och analys i epifluorescencemikroskop enligt HELCOM's riktlinjer <sup>14</sup>. Bildanalys enligt Blackburn et al (1997) ger samtidigt med cellantal, data om biovolym och cellmorfologier.

Detaljerade anvisningar ges i metodprotokoll i bilaga 2, där vikten av snabb preparation efter provtagning särskilt beaktats <sup>15</sup>.

Löst organiskt kol mäts efter hög temperatur oxidering med infraröd spektroskopi<sup>16</sup> enligt bilaga 3. Flagellater bestäms i samband med analys av växtplankton.

### **Plats/stationsval**

För val av mätstation är kännedom om lokala strömförhållanden eller medeltemperatur kartor av värde. Sötvattenplymer och speciellt turbulenta vattenområden (eg. betingat av strömmar och bottenpografi) bör undvikas om inte syftet är att mäta just dessa. Kustens påverkan på näringsförhållandena kan variera mellan 0 och 10-tals kilometer beroende på om det är öppen kust eller skärgårdsområde <sup>2</sup>. Definitionen av typområden inom projektet ”Bedömningsgrunder för kusthav” bör beaktas vid placering av stationer.

### **Observations/provtagningsmetodik**

Vattenprover tas med vattenhämtare. Lämplig volym är 5 liter och hämtare av exv. Niskin-typ (PVC-plast) kan användas. Se för övrigt bilaga 1 och 2.

Årstidsvariationen hos bakterieplankton är betydande, medan den rumsliga variationen är mindre <sup>1</sup>. För att få en god uppfattning om årsproduktion och medelbiomassa tas för närvarande c:a 18 prover per år på en koordinatsatt mätpunkt per lokal (exv. bassäng, typområde). Antalet provtagningar kan komma att reduceras (jmf under ”Övrigt”). Provtagning koncentrerad till månader med relativt liten mellanårsvariation kan utgöra en alternativ strategi vid reducerad ambitionsnivå. Augusti är preliminärt en rekommenderad månad, där minst två prov inom månaden bör tas.

I grundare områden (<25 m) är djupfördelningen av bakterieplankton relativt homogen. Fem prov används idag för att uppskatta integrerad produktion och medelhalten bakteriebiomassa i vattenpelaren. I djupare områden är halten i trofoga skiktet klart högre än i underliggande vattenmassa. Åtta prov används idag för att beskriva produktion och biomassa av bakterier på djupare lokaler (>100 m).

### **Tillvaratagande av prov, analysmetodik**

Prover för bestämning av bakteriehalt och -biomassa konserveras med formalin. Mikroskoppreparat görs helst inom 12 timmar och lagras fryst. Konserverat prov kan dock sparas 14 dagar innan mikroskoppreparat görs, med en försumbar påverkan på mätresultatet (se bilaga 2).

Prover för bakterieproduktion måste tillvaratas inom 30 min. och upptagsexperiment genomföras. Analys av radioisotop i upparbetade prover kan göras inom 7 dagar. För övrig analysmetodik hänvisas till bilaga 1.

### **Databehandling**

Bakterierna biovolym beräknas från c:a 1000 celler där medianvärdet för bakteriesamhället används som genomsnitt. Bakteriehållten beräknas från samma data och bakteriebiomassan

beräknas från dessa värden och ett allometriskt förhållande mellan kolinnehåll och biovolym hos bakterier<sup>17, 18</sup>. Se bilaga 2 för ytterligare information.

Bakterieproduktionen beräknas från nettoupptag av radioisotopen tymidin baserat på triplikaten. En omvandlingsfaktor från mol tymidin upptaget till antal celler bildat tillämpas som baseras på bestämningar från havsområdet. Produktion av biomassa beräknas från kolinnehåll per bakterie enligt ovan. Se bilaga 1 för ytterligare information.

### **Bakgrundsinformation**

Kunskap om strömningsförhållanden (exv. införsel av syrerikt vatten) och utbytstider är viktigt vid valet av plats för stationer och bidrar till en säkrare tolkning av resultaten. Referensinformation från ett motsvarande typområde, utan direkta föroreningskällor, ger möjlighet till direkta jämförelser med undersökningsområdet (jmf. bedömningsgrunder för kusthav). Tillgång till flera års (> 3) data ger möjlighet att ta hänsyn till naturlig variation. Vattentemperatur är dessutom av värde för tolkningen av data, framförallt på intensivstationer (>18 ggr år<sup>-1</sup>). Tillgång till övriga planktonvariabler och information om bottenfauna bidrar också till att öka säkerheten i en tillståndsbedömning. Kunskap om säsongsvariationen hos variablerna i typområdet är viktig om endast enskilda månader mätts.

### **Utvärdering**

Bakterieproduktionen räknas om till dagsproduktion under antagande att dygnsvariationen är mindre än säsongsvariationen<sup>19, 20</sup>. Om flera djup mätts integreras produktionen över bassängens medeldjup, medan ett viktat medelvärde beräknas för bakteriebiomassan. Kvoten mellan produktion och biomassa kan beräknas för enskilda djup eller integrerade djupprofiler.

Värdena för bakterieproduktion och biomassa samt P/B-kvot kan jämföras med referensstationer från motsvarande typområde där direkta föroreningskällor ej finns (jmf. bedömningsgrunder för kusthav). I vissa fall utgörs referensstationerna av utsjö- eller kuststationer i det nationella programmet. Tydliga avvikelser från ett angivet jämförintervall föranleder ytterligare undersökning av orsakerna vid behov.

Bakterievariablerna kan också jämföras med litteratordata från motsvarande biotoper. De har dock framförallt värde i en längre tidsserie där relativa förändringar kan dokumenteras. Bakteriebiomassan är ofta normalfördelad och signifikanta skillnader mellan lokaler, eller i ett provtagningsnät inom en lokal, kan analyseras via parametrisk variansanalys (ANOVA). Vid bedömning av påverkansgrad måste hänsyn tas till naturlig rumslig och tidsmässig variation inom och mellan lokaler. Information från intensivstationer med längre mätserier, företrädesvis från samma typområde, är i detta sammanhang värdefulla. En rekommendation är att värden signifikant högre än 75% quartilen hos mätvärdena för typområdet och referensperioden följs upp.

På tidsserier över 5 år kan trendanalys som angivet under ”Statistik” genomföras. Förändringar bör främst jämföras med utsjöstationer och klimatologiska variabler. Samvariation mellan en kuststation och utsjöstationer antyder att förändringarna är klimatologiskt betingade eller att det är en storskalig förändring av annat slag än klimat, t ex kvävedeposition med nederbörd.

Utvärdering av inverkan från UV-instrålning görs främst genom analys av skillnader mellan 0 m prov och underliggande värden i djupprofilen. Bakteriereproduktionen förväntas hämmas relativt kraftigare i ytan vid hög UV-exponering<sup>6</sup>. Skillnaderna förväntas visa specifika säsongsvariationer.

## **Kvalitetssäkring**

Kvaliteten säkras fortlöpande genom att iaktta noggrannhet i alla steg från provtagning till analys och följa angivna tidsbegränsningar i upparbetningen i de metodprotokoll som tillämpas.

Analyserna av bakterieantal och -biomassa har automatiserats med hjälp av bildanalys, där bakterierna identifieras automatiskt vis s.k. neuralt nätverk. Detta säkrar i sig reproducerbarhet och gör analysen operatoroberoende, samt mer ekonomisk.

Reproducerbarheten i upparbetningen av bakteriereproduktionsprover är god med nuvarande protokoll. Detta avser främst variansen inom replikat och nivån på blankvärden.

Standardfelet för cellantal skall understiga 5% mellan bildfält på ett mikroskop preparat. Bakterieantal och biovolym kvalitetskontrolleras genom jämförelse med andra data i djupprofilen och djupprofiler från motsvarande säsong. Triplikat som har ett CV högre än  $\pm 41\%$  bör kontrolleras och tydligt avvikande replikat ( $> 2$  SD från medelvärdet) ev. strykas. Likaledes bör blank prover som överstiger 200 dpm kontrolleras och tydligt avvikande värden ev. strykas. Data kvalitetskontrolleras genom jämförelse med andra data i djupprofilen och djupprofiler från motsvarande säsong. Årligen kalibreras bakteriereproduktionsmetoden mot tillväxt av bakterier i havsvattenkulturer.

Metoderna interkalibreras regelbundet med övriga laboratorier inom HELCOM.

## **Rapportering, presentation**

Data rapporteras till den regionalt kvalitetssäkringsansvarige för vidare leverans till den nationella biologiska databasen. I dagsläget förekommer undersökningstypen i det nationella programmet endast inom Umeå Marina Forskningscentrums ansvarsområde. Kompetens för kvalitetssäkring av bakterievariablerna finns därmed främst vid UMF.

Bakterieantal rapporteras som totalantal celler liter<sup>-1</sup> för hela samhället. Biomassa anges som  $\mu\text{mol kol liter}^{-1}$ . I förekommande fall anges de separat för olika morfologier. Provtagningskoordinater, djup, datum och tidpunkt utgör providentifiering. Antal räknade fält och bakterier anges, samt  $\pm$ SD mellan räknade fält.

Bakteriebiovolym rapporteras som medianvolymen för samhället i  $\mu\text{m}^3$ . I förekommande fall anges biovolymen för de olika morfologierna separat. Antal räknade fält och bakterier anges samt  $\pm$ SD för medelvärdet.

Bakteriereproduktion anges för hela bakteriesamhället som celler liter<sup>-1</sup> dag<sup>-1</sup>. Provtagningskoordinater, djup, datum och tidpunkt utgör providentifiering.

*Handbok för miljöövervakning*  
*Undersökningstyp*

Biomasseproduktion beräknas från cellproduktion och uppmätt biovolym, och anges som  $\mu\text{mol kol liter}^{-1} \text{ dag}^{-1}$ .

Områdeskartering presenteras fördelaktligen som konturlinjer eller staplar på karta över området med teknik enligt Geografiska InformationsSystem. Tidsserier visas som integrerade värden i x-y-figurer, liksom djupprofiler. För tidsserier kan antingen varje enskild provtagning redovisas eller, från intensivstationer, årsmedelvärden.

## **Datalagring, datavärd**

En regional databas för bakterievariabler finns vid Umeå Marina Forskningscentrum med mätvärden från 1984. Kontaktperson är Johan Wikner. Framledes bör miljöövervakningsdata från undersökningstypen utgöra en del av den nationella biologiska databasen.

## **Kostnadsuppskattning**

Provtagnings- och analyskostnaden för bakterieproduktion uppskattas till 80 kr per provdjup. Motsvarande kostnad för bakteriehalt och biovolym är 65 kr per provdjup. För morfologier tillkommer 10 kr per prov. Fartygskostnad och extra personalomkostnader (sjötillägg, traktamente och ev. övertid) är ej inräknad.

Samordningsvinster kan normalt göras mellan framförallt pelagialprovtagning men även pelagial och bottenfauna. Detta gäller främst fartygskostnad (2000 kr/person och dygn) och extra personalkostnader (sjötillägg 30 kr/timme, traktamente 240 kr/dygn). Ev. övertid debiteras med 1.5 ggr (18.00-22.00) resp. 2 ggr (22.00-06.00) lönekostnaden (ca. 100 kr/timme).

En salt och temperatur profil (CTD-profil) kostar 89 kr. Flagellatantal utgör delresultat från växtplanktonanalys. Kostnaden för ett växtplankton prov (slang 0-14 m) är 730 kr. Löst organiskt kol kostar 148 kr per provdjup. Alla kostnader gäller 1996 och för verksamhet vid Umeå Marina Forskningscentrum.

## **Övrigt**

Utvärdering av bakterievariablernas värde och styrka för miljötillståndsbeskrivning pågår och beräknas klar 1998. Möjligheterna att uppnå tillräcklig styrka med reducerad provtagning i tid (eg. en månad) skall undersökas, liksom samvariationen mellan intensivstationer på skalan 150 km. Mätserierna kommer också att användas för att identifiera förklaringsvariabler som kan bidra till höjd styrka och förenklad tolkning av resultaten. Slutligen kommer försök att bedöma gränsvärde för tydlig påverkan att göras.



## Referenser

1. Heinänen, A. and Kuparinen, J. 1991. Horizontal variation of bacterioplankton in the Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3150-3155.
2. Pitkänen, H., Kangas, P., Ekholm, P. and Perttilä, M. 1986. Surface distribution of total phosphorus and total nitrogen in the finnish coastal waters in 1979-1983. *National Board of Waters* 68, 40-54.
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. Wikner, J. and Hagström, Å. 1991. Annual study of bacterioplankton community dynamics. *Limnol. Oceanogr.* 36, 1313-1324.
5. 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.
6. Herndl, G.J., Muller-Edzards, G. and Frick, J. 1993. Major Role of Ultraviolet-B in Controlling Bacterioplankton Growth in the Surface Layer of the Ocean. *Nature* 361, 717-719.
7. Duxbury, T. 1985. Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms. In: *Advances in microbial ecology*, Marshall, K.C. (ed.). Plenum Press, London, p. 185-235.
8. Kousa, H., Kuparinen, J. and Wikner, J. 1997. *Pelagic biology in the Gulf of Bothnia*. Helsinki Commission. 3rd Periodic Helcom Assessment of the Baltic No. 3
9. Hirsch, R.M., Slack, J.R. and Smith, R.A. 1982. Techniques of trend analysis for monthly water quality data. *Water Resources Research* 18, 107-121.
10. Hirsch, R.M. and Slack, J.R. 1984. A non-parametric trend test for seasonal data with serial dependence. *Water Resources Research* 20, 727-732.
11. Clarke, G.M. 1988. *Statistics and experimental design*. Edward Arnold, London, p. 188.
12. 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.

13. Smith, D.C. and Azam, F. 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using <sup>3</sup>H-leucine. *Mar. Microb. Foodwebs* 6, 107-114.
14. Hobbie, J.E., Daley, R.J. and Jasper, S. 1977. Use of nucleporefilters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ. Microbiol.* 33, 1225-1228.
15. Turley, C.M. 1993. Direct estimates of bacterial numbers in seawater samples without incurring cell loss due to sample storage. In: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, P.F., K., Sherr, B.F., Sherr, E.B. and Cole, J.J. (ed.). Lewis Publishers, Boca Raton, p. 143-147.
16. Suzuki, Y., Tanoue, E. and Ito, H. 1992. A high-temperature catalytic oxidation method for the determination of dissolved organic carbon in seawater: analysis and improvement. *Deep-Sea Research* 39, 185-198.
17. Simon, M. and Azam, F. 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51, 201-213.
18. Norland, S. 1993. The relationship between biomass and volume of bacteria. 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. 303-307.
19. Riemann, B., Nielsen, P., Jeppesen, M., Marcussen, B. and Fuhrman, J.A. 1984. Diel changes in bacterial biomass and growth rates in coastal environments, determined by means of thymidine incorporation into DNA, frequency of dividing cells (FDC), and microautoradiography. *Mar Ecol Prog Ser* 227-235.
20. Wikner, J., Rassoulzadegan, F. and Hagström, Å. 1990. Periodic bacterivore activity counterbalances bacterial growth in the marine environment. *Limnol. Oceanogr.* 35, 313-324.

## **Bilaga 1. Metod protokoll för analys av löst organiskt kol.**

Är under utarbetning. Bifogas senare.

**Ersatt**

### **Syfte med utvärdering av mätprogram**

Att skapa ett marint miljöövervakningsprogram som kan ge en tillräckligt bra tillståndsbeskrivning till bästa ekonomi

### **Mål med utvärdering av mätprogram**

Att bestämma styrka hos pelagiala variabler

Att bestämma association mellan pelagiala variabler

Att bestämma variablernas känslighet för gödning och miljögifter

Att bestämma varabilitet inom olika månader

Att bestämma om reducerad provtagning enskilda månader ger tillräcklig styrka

Ersatt