

Antenne ORSTOM
Station d'Hydrobiologie de l'INRA
Avenue de Corz nt
74203 — THONON LES BAINS
(France)

Excrétion de carbone organique par le phytoplancton lémanique

Par Mauricette Feuillade, Ph. Dufour, J. Feuillade et J. P. Pelletier

Manuscrit reçu le 24 janvier 1986

ABSTRACT

The release of soluble organic carbon by the phytoplankton in the trophogenic layer of Lake Geneva has been investigated by ^{14}C method from March to November 1984. The carbon excretion rate varied from 0.01 to 0.5 mg $\text{C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ and depended primarily upon the rate of its photosynthetic assimilation. The carbon excretion rate varied generally between 2 and 5% of photoassimilated carbon and exceptionally exceeded 6%. These values were underestimated from part of heterotrophic reassimilation. The study of the carbon balance over 24 hours has shown that night excretion represents less than 10% of losses due to respiration.

Heterotrophic activity measured by ^{14}C glucose assimilation exhibited seasonal variations following the same general pattern as excretion. The quantity of phytoplankton excretion products appeared to be superior to the needs in organic compounds of heterotrophic organisms in the trophogenic layer.

1. Introduction

L'excrétion des produits du métabolisme photosynthétique, par le phytoplancton constitue un apport non négligeable de carbone organique dissous (COD) dans les milieux lacustres. Cette production dite extracellulaire n'est pas prise en compte par la méthode classique de mesure par le ^{14}C , qui n'estime que la production particulaire.

Le rejet de COD par les algues en culture et par les populations naturelles a été démontré pour les espèces marines comme pour les espèces d'eau douce, mais des divergences existent quant à son estimation. Elles ont même donné lieu à controverse entre défenseur d'un rejet important [17] et tenant d'un rejet faible [42]. Pour ce dernier les fortes valeurs observées sont imputables à des artefacts méthodologiques. Exprimées en pourcentage du C total fixé par photosynthèse, les valeurs du COD excrété se rapportant au phytoplancton lacustre sont inférieures à 10% pour Sharp [42], Jüttner et Matuschek [26], Coveney [15], Søndergaard et Schierup [45]. D'autres auteurs ont signalé des maximums dépassant 30% [6, 40, 50] et même 50% [8, 13, 47, 49], atteignant occasionnellement 95% [17].

Les valeurs absolues du rejet de COD sont importantes à connaître en tant que composantes du flux de carbone. Les valeurs extrêmes, toujours pour le phytoplancton lacustre, sont comprises entre 0 et 150 mg $\text{C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ avec des minimums pendant l'hiver et des maximums pendant la belle saison. Bien qu'en dehors de situations particulières (stress environnementaux importants), les valeurs absolues de matière organique dissoute excrétée soient considérées par certains comme relativement faibles, les auteurs sont unanimes

ORSTOM Fonds Documentaire

N° 26445

Cote : BM 12 JUIN 1989

P142

à reconnaître que le COD excrété constitue une source de C importante pour la microflore hétérotrophe.

Différents facteurs peuvent affecter la libération des produits extracellulaires. D'une part interviennent les conditions physico-chimiques du milieu: le relargage de COD est stimulé par des stress provoqués par une forte irradiation, des carences nutritives ou par la combinaison d'un faible éclaircissement et d'une température élevée [14, 49]. D'autre part la nature des espèces et leur état physiologique affectent la quantité et la nature du COD rejeté [21]; selon Hellebust [18] des cellules apparemment en bonne santé excrètent 4 à 18% de leur C photoassimilé, tandis qu'à la fin d'une fleur d'eau les rejets atteignent 17 à 38%.

Plusieurs chercheurs ont trouvé un pourcentage de COD rejeté par le phytoplancton plus important dans les eaux oligotrophes que dans les eaux eutrophes, cependant Chrost [11] montre que cette relation inverse entre le pourcentage de COD rejeté et la productivité du lac, donc son état trophique, est étroitement dépendante de l'activité hétérotrophe des bactéries. Pour cet auteur, la quantité de COD rejetée dans les lacs eutrophes serait plus importante mais comme l'activité bactérienne y est aussi plus grande, on mesure un pourcentage de COD rejeté plus faible. Le COD est une source d'énergie pour les populations hétérotrophes principalement les bactéries; celles-ci sont extrêmement dépendantes du COD excrété par les algues [41].

Le but de ce travail est d'évaluer le rejet des produits issus de la photosynthèse du phytoplancton, dans le Léman, au cours d'une année et d'en estimer l'importance pour la nutrition hétérotrophe bactérienne, ce qui permettra en outre de préciser une voie encore peu étudiée du cycle du carbone.

2. Matériel et méthodes

2.1 Mesure du rejet extracellulaire

Le rejet extracellulaire de matière organique par le phytoplancton est mesuré par la méthode du ^{14}C .

Les échantillons prélevés à différents niveaux sont préfiltrés sur tamis de 200 μm et incubés in situ, en parallèle à la lumière et à l'obscurité, dans des flacons de pyrex de 120 ou 250 ml, en présence de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (Radiochemical Center, Amersham Bucks, England), à raison de 7,5 $\mu\text{Ci}/120\text{ ml}$; apportés soit par une solution à 50/ $\mu\text{Ci} \cdot \text{ml}^{-1}$ préparée par dilution de la solution à 1 mCi (pour les cinétiques), soit par la solution commerciale à 50 μCi (pour les mesures mensuelles).

Deux types de mesures sont réalisés en zone pélagique:

1. Des cinétiques sur 24 h, en juillet, à partir du lever du jour, en surface et à 2,5 m.
2. Des mesures mensuelles, portant sur des incubations de 24 h commençant au lever du jour, en surface, 2,5 m, 5 m et 7,5 m.

Après incubation, les échantillons sont filtrés immédiatement au travers de membranes «ultrafines» en fibre de verre Whatman (GF/F), avec une dépression inférieure à 100 mm de mercure; la durée de la filtration n'excède pas 5 min. Le filtrat est recueilli dans un ballon, acidifié à $\text{pH} = 2,8$ avec de l' HCl 2 N. Le filtre est rincé par 10 ml d'eau du lac filtrée puis placé dans un dessiccateur

Au laboratoire, le filtrat est débarrassé du $^{14}\text{CO}_2$ par bullage pendant 2 h avec de l'air comprimé lavé et filtré; des parties aliquotes de 10 ml sont additionnées de 10 ml de liquide scintillant (Dynagel) et la radioactivité est mesurée par des comptages de 10 min dans un compteur à scintillation liquide¹⁾.

Pour déterminer le bruit de fond de la mesure de l'excrétion, à chaque campagne, 2 échantillons d'eau ont été marqués, filtrés immédiatement (témoins initiaux) et acidifiés puis aérés par bullage, toutes les conditions étant absolument identiques à celles des échantillons incubés.

La valeur des témoins initiaux a été soustraite des valeurs des échantillons. Elle est plus faible (150 ± 10 dpm pour $7,5 \mu\text{Ci}$) pour la solution $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ préparée par dilution de la solution commerciale à 1 mCi que pour la solution commerciale à $50 \mu\text{Ci}$ (750 ± 30 dpm pour $7,5 \mu\text{Ci}$). Avec cette dernière solution de marquage nous avons observé pour les échantillons incubés à l'obscurité des valeurs supérieures à celles des témoins initiaux.

2.2 Mesure de l'assimilation du carbone

Pour estimer le ^{14}C particulaire les filtres sont exposés aux vapeurs HCl pendant 20 min, séchés 48 h dans un dessiccateur, placés dans des fioles à scintillation en polyéthylène à bas bruit de fond avec 5 ml de liquide scintillant et laissés 20 h au réfrigérateur. Des essais préalables ont confirmé que le séjour au réfrigérateur préconisé par Passmann et al. [38] améliore le rendement du comptage.

Le ^{14}C incorporé est converti en C assimilé en tenant compte du CO_2 total déterminé à partir des valeurs de l'alcalinité et du pH. Pour le calcul du C rejeté, le matériel marqué au ^{14}C dans les fractions particulaire et dissoute est considéré comme ayant la même activité spécifique ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$) que le pool de C minéral dissous. Un facteur de discrimination isotopique $^{12}\text{C}/^{14}\text{C}$ de 1,06 est employé.

2.3 Mesure de l'activité hétérotrophe

L'activité hétérotrophe est estimée par l'assimilation de glucose. Les échantillons, prélevés entre la surface et 7,5 m sont préfiltrés sur $60 \mu\text{m}$, incubés pendant 4 h à l'obscurité et à la température du prélèvement en présence du glucose ^{14}C , puis filtrés sur membrane en ester de cellulose de $0,2 \mu\text{m}$ (Sartorius). L'activité de la fraction de glucose ^{14}C assimilé et retenue sur les filtres est mesurée par scintillation liquide. La fixation non biologique est estimée par des sous-échantillons formolés avant inoculation du ^{14}C (0,4% de formol). La vitesse d'assimilation maximale, V_{max} (en présence de concentrations de glucose non limitantes) est évaluée chaque mois par l'approche cinétique de Wright et Hobbie [53]. Aux concentrations utilisées ($0,2$ à $4 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), l'assimilation de glucose peut être considérée comme essentiellement liée à l'activité hétérotrophe des bactéries.

1) Les essais de concentration par évaporation sous vide à 40°C , du filtrat neutralisé, ont abouti à une sous-estimation systématique des résultats; ainsi qu'à la formation de particules, phénomène déjà observé par Jensen et Søndergaard [23]. Les résultats n'ont pas été pris en compte dans ce travail.

3. Résultats

3.1 Rejet extracellulaire

Les mesures ont été faites en double; les valeurs indiquées sont les moyennes.

3.1.1 Etude de la cinétique

On distingue trois périodes dans le rejet du COD photoassimilé depuis le début de l'expérience (fig. 1).

- Une phase de faible rejet en début d'incubation, pendant laquelle les algues sont peu ou pas marquées et excrètent des produits carbonés dont une faible proportion est radioactive.
- Une phase où le rejet est maximal, entre 8 h et 17 h.
- Une troisième période qui commence après 17 h et dure la nuit, où le ralentissement de l'excrétion peut être relié à l'absence de lumière.

Le COD rejeté est plus important en surface qu'à 2,5 m, alors qu'on observe l'inverse pour la production primaire (à l'exception de la première mesure après le lever du soleil), ce qui confirme l'effet stimulant des forts éclaircissements sur l'excrétion.

Pendant la nuit le phytoplancton n'assimile plus le $^{14}\text{CO}_2$ tandis que 19% (en surface) à 21% (à 2,5 m) du ^{14}C incorporé à la lumière sont perdus, à la fois par l'excrétion (1,4 à

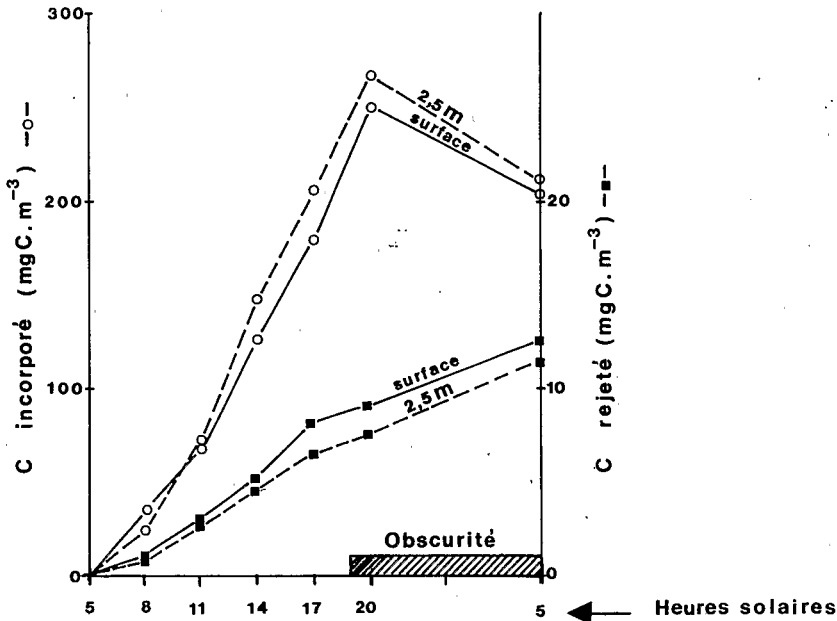


Figure 1. Cinétique sur 24 h, du C organique produit par photosynthèse (C particulaire + C organique dissous excrété) en $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3}$ et du carbone organique dissous excrété en $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3}$, en surface et à 2,5 m, les 10 et 11 juillet 1984.

Figure 1. 24-h kinetics of photosynthetic organic carbon (particular C + dissolved organic excreted C, $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3}$), and of excreted dissolved organic C ($\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3}$) at the surface and 2.5 m, 10 and 11 July 1984.

Table 1. Night losses of carbon resulting from daily particulate production (10–11 July 1984).

Tableau 1. Bilan des pertes nocturnes en carbone de la production journalière particulaire (Léman au large de Thonon, 10–11 juillet 1984).

	Période considérée	Profondeur d'incubation	
		Surface	2 m 50
Production particulaire diurne ($\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3}$)	5 h–20 h	250,9	267,6
Production particulaire subsistant en fin de nuit ($\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3}$)	5 h–5 h	204,1	211,8
Perte de C particulaire pendant la nuit:			
totale en $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3}$ (mesurée)	20 h–5 h	46,8	55,8
(en % de la production diurne)		(18,7%)	(20,9%)
par excrétion: en $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3}$ (mesurée)		3,4	3,9
(en % de la production diurne)		(1,4%)	(1,5%)
par respiration: en $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3}$ (estimée)		43,4	51,9
(en % de la production diurne)		(17,3%)	(19,4%)

1,5%) et par la respiration (17 à 19%) (tabl. 1). On remarque que dans les conditions physico-chimiques et biologiques de cette étude, l'excrétion du C photoassimilé représente une perte faible par rapport à celle qui peut être attribuée à la respiration. Toutefois ces valeurs sont calculées dans l'hypothèse d'une absence de réassimilation par les hétérotrophes du COD excrété.

Les mesures effectuées au cours des 24 heures ont permis de calculer les vitesses d'assimilation et de rejet en fonction de la durée d'incubation (tabl. 2). Les vitesses de rejet de COD sont en progression pendant les premières heures puis restent à peu près constantes. Quant au pourcentage de COD rejeté, après une incubation de 3 ou 6 h, il change peu jusqu'à la fin du jour pour augmenter durant la nuit, le rejet de COD n'étant plus compensé par l'assimilation de C minéral.

3.1.2 Variations au cours d'une année (fig. 2)

La vitesse de rejet est maximale de mai à septembre, les valeurs se situent alors entre 0,2 et 0,5 $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ aux niveaux de production maximale.

Le rejet est le plus souvent compris entre 2 et 5% du carbone photoassimilé et n'excède qu'exceptionnellement 6%. Le pourcentage de l'excrétion est le plus souvent maximal en surface.

3.1.3 Relations entre l'excrétion et les facteurs accompagnants

Nous avons recherché les régressions de l'excrétion sur l'assimilation du carbone et les facteurs du milieu (température, éclaircissement) dont l'influence sur l'excrétion a été signalée dans l'introduction. Les valeurs des r^2 obtenues sont présentées dans le tableau 3. L'excrétion apparaît surtout liée à l'assimilation photosynthétique mais aussi à l'éclaircissement incident instantané. Elle semble en revanche peu dépendante de la température. Sur l'ensemble des données des quatre niveaux étudiés la régression suivante a été calculée:

$$\text{Excrétion} = -0,0047 + 0,0363 \text{ assimilation} \quad (r^2 = 0,87) \quad (1)$$

qui est présentée figure 3.

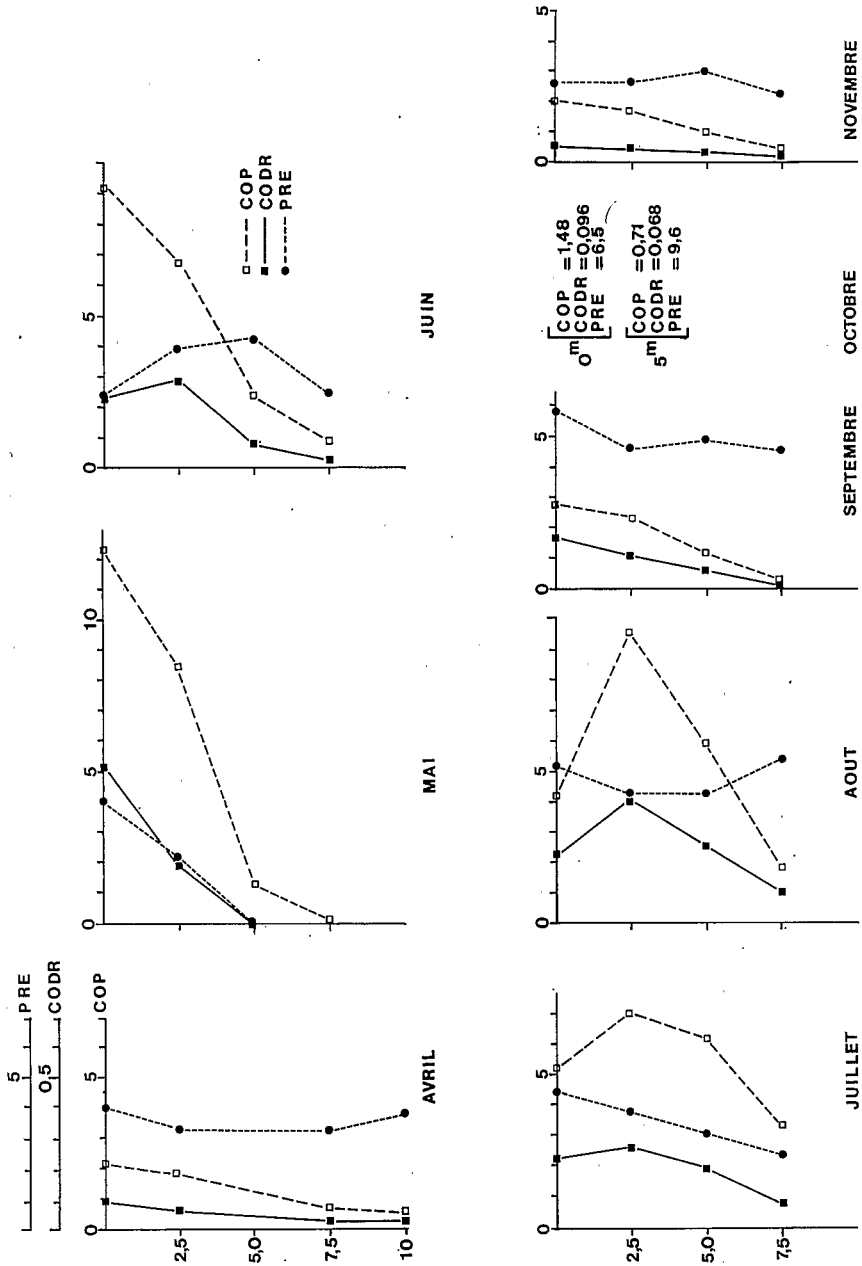


Figure 2. Profils verticaux au cours de l'année 1984 des paramètres suivants: COP = carbone organique produit par photosynthèse (= C particulaire + CODR, en $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) (les pertes par respiration du C assimilé ne sont pas prises en compte); CODR = carbone organique dissous rejeté (= extracellulaire) en $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$; PRE = rejet extracellulaire en pourcentage du COP.

Figure 2. Vertical profiles, during 1984, of: COP = photosynthetic organic carbon (= particular C + CODR, $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) (cellular respiratory losses of assimilated carbon are not considered); CODR = extracellular release of organic carbon; PRE = percent extracellular release.

Table 2. Variations of carbon fixation rate, photoassimilated carbon excretion rate, and percent photoassimilated extracellular release as a function of incubation length during a 24 h cycle (10 to 11 July 1984; local solar time).

Tableau 2. Variations de la vitesse d'incorporation du carbone, de la vitesse de rejet du carbone photoassimilé et du pourcentage de carbone photoassimilé rejeté, avec la durée d'incubation au cours d'un cycle nyctéméral (10-11 juillet 1984). Les heures d'incubation sont données en heures solaires.

Niveau des échantillons	Heures d'incubation	Durée d'incubation en h	COP (mg C · m ⁻³ · h ⁻¹)	CODR (mg C · m ⁻³ · h ⁻¹)	PRE (en %)
Surface	5-8	3	12,14	0,35	2,85
	5-11	6	11,78	0,51	4,30
	5-14	9	14,77	0,59	4,02
	5-17	12	15,67	0,69	4,39
	5-20	15	17,33	0,61	3,51
	5-5 (+ 24)	24	9,03	0,52	5,80
2 m 50	5-8	3	8,50	0,26	3,11
	5-11	6	12,14	0,43	3,53
	5-14	9	16,95	0,52	3,09
	5-17	12	17,74	0,55	3,12
	5-20	15	18,35	0,51	2,75
	5-5 (+ 24)	24	9,30	0,48	5,15

COP = photosynthetic organic carbon. CODR = extracellular release of organic carbon. PRE = percent extracellular release (note: COP = particular C + CODR. Cellular respiratory losses of assimilated carbon are not considered.)

COP = carbone organique produit par photosynthèse (= C particulaire + CODR, les pertes par respiration du C assimilé n'étant pas prises en compte). CODR = carbone organique dissous rejeté. PRE = pourcentage du carbone photosynthétisé qui est rejeté à l'extérieur des cellules pendant la période considérée.

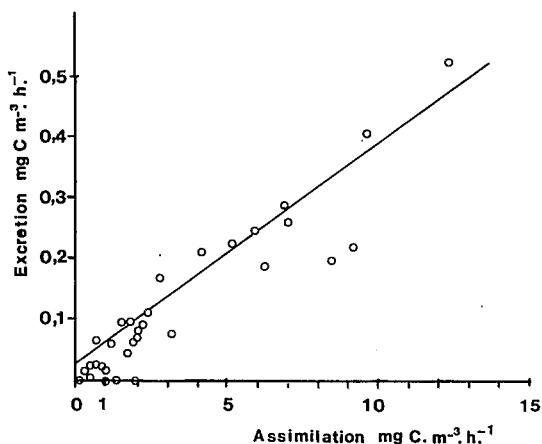


Figure 3. Relation entre le C assimilé (C particulaire + C organique excrété) et le C organique excrété.
Figure 3. Relation between assimilated carbon (= COP + CODR) and organic carbon released (CODR).

Si nous considérons seulement les données des trois niveaux en dessous de la surface (2,5, 5 et 7,5 m) nous retrouvons la forte corrélation entre excrétion et assimilation du carbone:

$$\text{Excrétion} = -0,00004 + 0,0359 \text{ assimilation} \quad (r^2 = 0,89). \quad (2)$$

L'amélioration de cette corrélation par rapport à celle obtenue sur les seules données de la surface:

$$\text{Excrétion} = 0,29 + 0,0345 \text{ assimilation} \quad (r^2 = 0,83) \quad (3)$$

suggère que les valeurs de surface peuvent être perturbées par des facteurs non pris en compte susceptibles de modifier rapidement la vitesse d'excrétion.

3.2 Relation entre l'assimilation hétérotrophe et le rejet extracellulaire phytoplanctonique

En raison de l'hétérogénéité spatio-temporelle des organismes dans l'épilimnion, seules sont comparées l'excrétion et l'assimilation hétérotrophe d'échantillons prélevés simultanément. Sur ces échantillons l'assimilation hétérotrophe a été mesurée et l'excrétion a été déduite des mesures de production primaire par application des taux d'excrétion (excrétion/production primaire) mesurés sur d'autres échantillons prélevés quelques heures auparavant.

Le rejet extracellulaire du phytoplancton et l'assimilation hétérotrophe du bactérioplancton varient au cours de l'année de façon similaire (fig. 4). Un premier maximum commun en mai est suivi d'un second maximum commun en août et septembre. Le rejet extracellulaire reste élevé en octobre tandis que l'assimilation hétérotrophe chute. La décroissance de juin et juillet est observée à la fois pour l'excrétion et l'assimilation hétérotrophe. Il en est de même des faibles valeurs de mars et novembre.

Si on admet avec Kuparinen [28] que le potentiel hétérotrophe vis-à-vis du glucose (V_{\max} glucose) représente 5 à 10% de l'assimilation hétérotrophe globale du carbone, on s'aperçoit (fig. 4) qu'au début du printemps, l'excrétion phytoplanctonique excède l'assimilation hétérotrophe. En mai, tandis que se développe le bloom algal printanier, l'assimilation hétérotrophe rejoint le niveau de l'excrétion phytoplanctonique. A cette époque, la plus grande partie des produits d'excrétion du phytoplancton pourrait donc être réutilisée par le bactérioplancton. Tout le reste de l'année, de juin à novembre, l'activité excrétrice du phytoplancton excède largement l'assimilation hétérotrophe globale.

Table 3. Calculated determination coefficient (r^2) of regression, and several variables at different depths. Variables and excretion measured at the same point.

Tableau 3. Valeurs de r^2 obtenues lors des calculs de la régression entre l'excrétion et diverses variables aux différentes profondeurs. Toutes variables mesurées aux mêmes niveaux que l'excrétion.

Régression avec	Assimilation	Eclaircissement	Température
Aux quatre profondeurs	0,88	0,52	0,20
En surface	0,83	0,64	0,00
Aux trois profondeurs inférieures	0,89	0,65	0,40

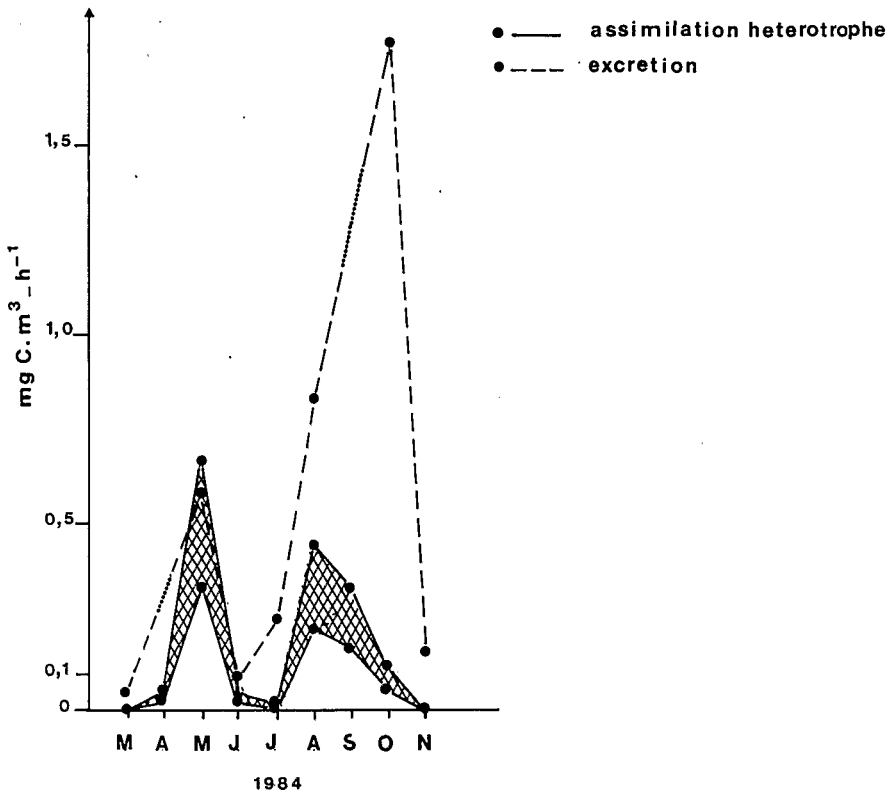


Figure 4. Variation au cours de l'année 1984 de l'excrétion du phytoplancton et de l'assimilation hétérotrophe du bacterioplancton. Les valeurs sont les moyennes calculées pour la couche 0-7,5 m. L'assimilation hétérotrophe comprise entre $V_{\max} \text{ glucose} \times 10$ et $V_{\max} \text{ glucose} \times 20$ est représentée par la zone hachurée. Les valeurs d'excrétion ont été évaluées sur des échantillons distincts de ceux de la figure 2 (cf. 3.2).

Figure 4. Comparative variations during 1984 of phytoplanktonic excretion and of heterotrophic assimilation by bacterioplankton. Values are means for the 0-7.5 m layer. Heterotrophic assimilation estimated between $V_{\max} \text{ glucose} \times 10$ and $V_{\max} \text{ glucose} \times 20$ corresponds to the hatched zone. Excretion values have been evaluated from different samples than those in figure 2 (cf. 3.2).

4. Discussion

En raison des nombreux artefacts possibles dans la mesure du rejet extracellulaire de carbone par la technique du ^{14}C , une attention particulière a été apportée à la méthodologie. Rappelons que les causes d'erreurs les plus importantes sont l'élimination incomplète du $^{14}\text{CO}_2$ du filtrat, la présence d'impuretés marquées dans le traceur radioactif, la libération de substances organiques à la suite de la rupture des cellules et la stimulation de l'excrétion par des stress (chocs thermiques ou lumineux ...) au cours des manipulations. 30 min d'aération par bullage à un débit de $200 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, en milieu acide, éliminent 99,99% de la radioactivité des témoins au temps t_0 . Même après 2 h de bullage, une activité très faible subsiste; bien que représentant seulement 0,001% de la radioactivité initiale, elle ne doit pas être négligée, surtout lorsqu'il s'agit d'échantillons peu productifs.

Elle représente le bruit de fond de la mesure de l'excrétion et correspond à l'activité résiduelle de la solution de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. Elle peut être due à du ^{14}C minéral non éliminé et (ou) à des contaminants organiques marqués; ces derniers ont pu être détectés par des séparations chromatographiques. En outre, lorsque le marquage est réalisé avec la solution commerciale à 50 $\mu\text{Ci/ml}$, la diminution de la radioactivité dans les témoins maintenus à l'obscurité (perte de 13 à 35% du ^{14}C résiduel en 24 h), suggère une consommation d'une partie du ^{14}C organique contaminant. Des auteurs [33] préconisent l'utilisation de solutions fraîchement préparées à partir de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ et préfiltrées, et de les irradier aux U.V. afin d'éliminer les impuretés organiques.

L'emploi de fixateurs tels que le formol serait susceptible de provoquer une libération de ^{14}C cellulaire [1, 43]. De même, le transfert au laboratoire des échantillons maintenus à l'obscurité conduirait selon Watt [50] à une augmentation de l'excrétion. Bien que Watanabe [49] ait réfuté l'effet significatif du formol et que Blaauboer et al. [8] aient précisé les conditions qui supprimeraient l'effet du délai de transfert (obscurité, dans la glace fondante ...), le choix d'une filtration immédiate sur le bateau, dès la fin de l'incubation, écarte ces risques. La durée de la filtration a rarement excédé 3 min, afin d'éviter une éventuelle lyse des cellules provoquée par le séjour prolongé sur la membrane [1, 35]. La durée de filtration est liée à l'intensité de la dépression utilisée, mais une dépression trop forte peut provoquer une rupture des cellules, essentiellement avec les organismes fragiles. Pour Herbland [19], la dépression ne doit pas dépasser 75 mm de mercure. Blaauboer et al. [8] ont observé sur des échantillons prélevés au moment d'une fleur d'eau à *Dinobryon divergens* une augmentation du rejet de COD lorsque la dépression excède 300 mm de mercure. Ces résultats concordent avec ceux de Smith [44] et avec ceux que nous avons observé avec *O. rubescens*. Nous avons choisi de travailler à un vide de 100 mm de mercure. Les filtres en fibre de verre GF/F ont été employés car ils retiennent 100% des algues, n'endommagent pas les cellules [25] et n'adsorbent que des quantités négligeables de composés organiques dissous [5]; en outre, leur texture permet une filtration rapide.

Le choix de la durée d'incubation est difficile et les points de vue sont contradictoires. Avec les échantillons peu productifs les valeurs absolues de COD rejeté lors des incubations courtes sont à la limite de la sensibilité de la méthode; on a donc intérêt à augmenter la durée d'incubation. Une durée de 24 h paraît optimale. D'une part, selon Watanabe [49] les produits excrétés à l'obscurité sont différents de ceux rejetés à la lumière; c'est pourquoi leur étude en tant que substrat pour la nutrition hétérotrophe doit être faite sur 24 h lorsque des cinétiques ne sont pas réalisées. D'autre part les cinétiques étudiées en été ont montré que les vitesses de rejet de COD sont assez peu différentes pour les incubations allant de 6 à 24 h (tabl. 2) et qu'une lyse cellulaire est peu probable en dépit des forts éclaircissements ($1050 \mu\text{Einst} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ à midi) et des températures élevées (20°C) observées pour les eaux de surface pendant la journée. Avec les incubations courtes, les pools carbonés ne sont pas uniformément marqués, le rejet extracellulaire est alors sous-estimé. C'est ce que l'on observe en début d'incubation (fig. 1). Selon Storch et Saunders [46] et Jensen et al. [24], un minimum de 24 h est nécessaire pour que l'équilibre isotopique soit achevé. Au contraire, pour d'autres auteurs [51, 52] le déséquilibre isotopique n'est pas un problème important dans les incubations courtes, lesquelles évitent une sous-estimation de la vitesse d'excrétion en minimisant l'assimilation hétérotrophe des exsudats marqués. Nalewajko et al. [36] ont constaté, avec des échantillons d'eau de lac, que les pourcentages

d'excrétion déterminés sur une longue période (7–8 h) sont plus faibles que pour une incubation courte (1 h). Ils ont montré à l'aide de cultures axéniques et de cultures auxquelles ils ont ajouté des bactéries, que la consommation par ces dernières des produits extracellulaires des algues était la cause de cette diminution. Elle intervient après une phase de latence nécessaire aux bactéries pour l'utilisation des produits extracellulaires. Ils en concluent que les mesures après incubations courtes représentent le rejet extracellulaire brut tandis que celles après incubations longues donnent les valeurs nettes, détectant seulement les substances non consommées par les hétérotrophes.

Au Léman, lac méso-eutrophe, le pourcentage de COD excrété mesuré n'a qu'exceptionnellement dépassé 6% du C total fixé par photosynthèse. Les valeurs les plus élevées observées en surface au printemps et en été (fig. 2) sont attribuables à l'effet des fortes intensités lumineuses. En juillet et août elles sont associées à une inhibition très marquée de la photosynthèse par la lumière. Plusieurs auteurs ont également observé une excrétion élevée dans des conditions d'éclairement inhibitrices pour la photosynthèse (in Tilzer et Horne [48]). Des expériences de laboratoire avec du phytoplancton naturel ont démontré l'effet de la lumière inhibitrice sur l'excrétion [50], expliqué à la fois par l'endommagement des membranes cellulaires et par l'augmentation de la photorespiration.

Les vitesses d'excrétion du COD sont bien corrélées avec les vitesses d'assimilation du carbone (fig. 3). La moins bonne régression trouvée en surface se conçoit puisqu'à ce niveau les forts éclaircissements peuvent exercer des effets opposés, à la fois inhibiteur de la photosynthèse et stimulateur de l'excrétion, favorisant en particulier le rejet de glycolate [16] constituant important du COD. L'équation (2) représente donc mieux la relation entre l'excrétion et l'assimilation que celles qui sont calculées soit sur les données de surface, soit sur l'ensemble des données des 4 niveaux étudiés.

Les valeurs absolues de COD rejeté par le phytoplancton du Léman sont faibles (inférieures à $0,6 \text{ mg C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$). Cependant une partie seulement du COD excrété réassimilé par les bactéries a été mesurée (environ 50% des bactéries étant retenues sur les filtres GF/F d'après Jones et al. [25]).

Il ne fait aucun doute que dans les systèmes aquatiques les hétérotrophes sont capables d'utiliser des produits excrétés par le phytoplancton. Les populations bactériennes apparaissent fortement adaptées pour l'utilisation des produits d'excrétion relargués par les algues hôtes [34]. Chrost et Faust [12] ont calculé que le bactérioplancton utilise de 18 à 77% du COD excrété. Une utilisation de 100% des excréments algaux a même été fréquemment rapportée (in Coveney [15]).

Dans les eaux naturelles, jusqu'à 50% de l'activité hétérotrophe bactérienne peut être réalisée aux dépens des produits extracellulaires relargués par les algues pendant les blooms de phytoplancton [9, 31]. Des mesures faites par Berman et Kaplan [7] à l'aide d'une chambre de diffusion, sur des échantillons du lac Kinneret, ont montré que les hétérotrophes incorporent de 0,8 à $38,4 \mu\text{g C} \cdot \text{l}^{-1}$ en 12 h, soit 0,2 à 6% de la production primaire nette; ce flux de COD pourrait permettre une production journalière d'environ 2 à 3×10^6 bactéries $\cdot \text{ml}^{-1}$. Il y aurait donc un rapide transfert du C organique du phytoplancton aux bactéries via le pool des produits extracellulaires [9, 30]. C'est l'utilisation rapide des produits d'excrétion algaux qui empêche une augmentation de ces composés organiques au-delà des faibles concentrations [3, 30, 51].

Les matières organiques dissoutes n'ont pas été dosées dans le Léman l'année de nos mesures. Une étude ancienne [32] met en évidence un cycle annuel des «hydrates de

carbone» de poids moléculaire supérieur à 1000, qui est relié à l'activité biologique. En mai et juillet 1973, des «glucides» sont libérés par excrétion et lyse du phytoplancton qui présente alors un maximum d'abondance. Leurs concentrations diminuent un mois plus tard, en juin puis en août, sous l'effet de ce que l'auteur suppose être l'assimilation bactérienne. Bell [2] ainsi que Kuparinen et al. [29] observent un décalage semblable entre le développement du bloom phytoplanctonique printanier et l'accroissement de la production bactérienne. Ce même décalage s'observe sur la figure 4 entre mars et avril d'une part et juillet et août d'autre part. A d'autres époques, s'il existe, il doit être moins important et n'est pas détecté par le pas mensuel de notre échantillonnage. En effet, contrairement aux matières organiques de fort poids moléculaire seules prises en compte par Lugrin [32], une grande partie des produits d'excrétion du phytoplancton est composée de petites molécules rapidement métabolisées par les bactéries [12, 22, 37]. La seconde de ces deux assertions est d'ailleurs confirmée par les vitesses de renouvellement du glucose et des acides aminés dans l'épilimnion du lac entre mai et octobre qui varient de un à quelques jours avec un maximum exceptionnel de 23 et 27 jours en juillet (Dufour, en prép.). L'utilisation préférentielle des produits d'excrétion de faible poids moléculaire aurait d'ailleurs pour conséquence d'enrichir les eaux naturelles en matières organiques de fort poids moléculaire [37].

Entre mars et octobre, dans la couche d'eau de 0 à 7,5 m les valeurs d'excrétion carbonée sont égales ou le plus souvent supérieures aux valeurs d'assimilation hétérotrophe carbonée (fig. 4). L'excédent de carbone organique dissous passe vraisemblablement dans les couches inférieures par diffusion et advection. Dans ces couches, compte tenu de leur grande épaisseur, 300 mètres au point des prélèvements, les activités hétérotrophes et minéralisatrices sont globalement supérieures à ce qu'elles sont dans la couche supérieure (Dufour, en prép.). Au contraire l'excrétion y est présumée très faible d'après la figure 2 et les mesures de production primaire sur toute la colonne d'eau [39]. Cette inversion de l'importance relative de l'excrétion et de l'assimilation hétérotrophe dans les couches profondes permet de résorber l'excédent de carbone organique dissous produit en surface.

Signalons ici que les valeurs de cet excédent de carbone organique dissous en surface ne sont pas connues avec précision. En effet, nos évaluations d'assimilation hétérotrophe globale sont basées sur une extrapolation des mesures d'assimilation du glucose qui d'après Kuparinen [28] représente 5 à 10% de l'assimilation de C organique par les bactéries en milieu limnique et saumâtre (cf. 3.2). Or la contribution réelle du glucose dans les pools de matière organique et dans leur flux varie considérablement selon les écosystèmes. Opérant une revue de la littérature disponible, Hoffle et al. [20] constatent que le glucose représente de 3 à 30% des flux hétérotrophes de carbone dans les lacs eutrophes. Les espèces bactériennes et leur métabolisme sont fortement adaptés au substrat disponible dans le milieu [27]. Ainsi, sur 200 souches bactériennes isolées du delta du Rhône, moins de 40% attaquent le glucose [4]. Il est donc difficile de déduire des mesures d'assimilation du glucose mieux qu'un ordre de grandeur de l'assimilation hétérotrophe globale. Les méthodes manquent pour estimer ce dernier paramètre dans les milieux naturels. Des mesures plus directes de réutilisation des produits d'excrétion du phytoplancton par les bactéries sont en projet. A l'heure actuelle, on peut uniquement affirmer sur la base des données de la littérature et des indices fournis ici, que les bactéries assimilent une fraction non négligeable des produits d'excrétion du phytoplancton. On ne

peut donc évaluer réellement le COD excrété par le phytoplancton qu'à l'aide de techniques qui inhibent l'activité bactérienne ou qui excluent les bactéries du milieu d'incubation; encore faudrait-il que le phytoplancton n'utilise pas ses propres exsudats. Le contraire a été démontré par Chang [10] pour deux Cyanophycées: *Oscillatoria rubescens* et *Synechococcus*, la première n'utilisant que ses propres exsudats, la seconde utilisant aussi ceux d'autres organismes. Ces remarques tendent à démontrer la sous-estimation probable des valeurs d'excrétion présentées dans cet article et dans la littérature.

5. Résumé

Le rejet de carbone organique par le phytoplancton est étudié à l'aide de la technique du ^{14}C . Les échantillons sont incubés in situ. La séparation des fractions particulières et solubles a lieu immédiatement après l'incubation par filtration sur membrane GF/F sous un vide < 100 mm de mercure. L'élimination du $^{14}\text{CO}_2$ est obtenue par un bullage à pH 2,8 pendant 2 h. Deux types de mesures sont réalisées, des cinétiques sur 24 h et des mesures mensuelles à différents niveaux du lac entre la surface et 7,5 m qui représente l'essentiel de la couche trophogène.

Aux mêmes dates, l'activité hétérotrophe est mesurée par la vitesse d'assimilation maximum du glucose ^{14}C par les microorganismes retenus sur des filtres de 0,2 μm de porosité (approche cinétique de Wright et Hobbie [53]. On estime ensuite l'assimilation hétérotrophe globale en admettant avec Kuparinen [28] qu'elle représente entre 10 et 20 fois l'assimilation du glucose seul.

La vitesse d'excrétion du carbone mesurée sur 24 h est comprise entre 0,01 et 0,5 $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ (tabl. 2, fig. 2), ce qui représente 2 à 5% (exceptionnellement 6%) du carbone photoassimilé. La vitesse d'excrétion du carbone dépend en premier lieu de la vitesse d'assimilation du carbone par photosynthèse et pour une moindre part de l'éclairement incident instantané (fig. 3, tabl. 3). En plus de son influence sur la production l'éclairement semble avoir un effet stimulant sur l'excrétion, comme le suggèrent les plus forts pourcentages observés en surface au printemps et en été (fig. 2). En juillet et août les forts pourcentages sont associés à une inhibition très marquée de la photosynthèse par la lumière.

L'étude du bilan de carbone sur 24 h (tabl. 1) montre que pendant la nuit les pertes carbonées sont dues en majeure partie à la respiration, l'excrétion nocturne représentant moins de 10% des pertes par respiration. L'examen critique des méthodes utilisées a permis de montrer que la plupart des erreurs recensées dans la littérature ont été écartées, toutefois une sous-estimation de l'excrétion liée à sa réassimilation rapide par les organismes hétérotrophes reste probable.

Au cours de l'année, le rejet extracellulaire de carbone par le phytoplancton et l'assimilation hétérotrophe globale du bactérioplancton ont varié de façon similaire (fig. 4). Excepté en mai, le rejet extracellulaire du phytoplancton excède largement l'assimilation dans la couche de 0 à 7,5 m. On en déduit que le carbone organique dissous excrété en excès est assimilé puis minéralisé en dessous de la couche trophogène, entre 7,5 et 300 m. En conclusion les quantités de carbone organique soluble rejetées par le phytoplancton sont faibles et représentent des pertes carbonées peu importantes en comparaison de celles attribuées à la respiration. Néanmoins le COD excrété constitue un substrat

important pour les organismes hétérotrophes; dans la zone trophogène il apparaît même supérieur aux besoins de ces organismes.

SUMMARY

Release of dissolved organic carbon (DOC) by the phytoplankton of Lake Geneva (France, Switzerland) was studied in 1984 by means of an in situ tracer technique. Immediately after sample incubation, particulate and dissolved material was separated on board, using GF/F glass membrane filters and a low vacuum pressure < 100 mm Hg. Residual inorganic $^{14}\text{CO}_2$ was removed by bubbling at pH 2.8 for 2 h. Two types of experiments were conducted: the release kinetics over 24 h, and monthly measurements at different depths between the surface and 7.5 m, the trophogenic layer where most of the phytoplanktonic activity occurs.

Heterotrophic activity was measured by maximum glucose assimilation rate of microorganisms retained on 0,2 μm pore size filters [53]. Then global heterotrophic assimilation rate was estimated assuming that it is 10 to 20 times the glucose assimilation rate [28].

Rates of C excretion, as deduced from 24-h measurements, ranged from 0.01 to 0.5 $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ (table 2, fig. 2), which is equivalent to 2–5 % (occasionally > 6%) of photoassimilated C. Excretion rate was dependent primarily on photosynthetic C assimilation rate and, to a lesser extent, on instantaneous irradiance (table 3, fig. 3). In addition to increasing primary production high intensities of incident light seemed to directly stimulate excretion, based on observations of higher excretion percentages in near surface waters in spring and summer (fig. 2). In July and August these high-excretion percentages were associated with increased light inhibition of photosynthetic rate. Our 24-h study of C balance (table 1) showed that during the night, C losses were largely attributable to respiration. Night excretion represented < 10 % of respiratory losses. A critical examination of the methods used convinces us that we avoided most of the known technical errors. Nevertheless, an underestimation of C excretion rates due to immediate reassimilation is likely.

During the course of the year, similar variations in phytoplanktonic extracellular C release and gross heterotrophic assimilation by bacterioplankton were observed (fig. 4). With one exception (in May), extracellular release by phytoplankton largely exceeded organic C assimilation between the surface and a depth 7.5 m. We believe that excreted DOC that is not immediately consumed by bacteria in the trophogenic zone, is assimilated and mineralized at greater depths (7.5–300 m).

We conclude that soluble organic C excreted by phytoplankton in Lake Geneva represents little loss of assimilated C, as compared to losses due to respiration. Nevertheless, excreted DOC constitutes an important substrate for heterotrophic organisms. In the surface layers, DOC is present in quantities exceeding the requirements of heterotrophic bacterioplankton.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient leurs collègues, J. Barraud, P. Chifflet, M. Colon, E. Menthon et J.P. Moille, pour leur précieuse collaboration ainsi que G. Barroin pour ses critiques et F. Bouvet pour la frappe du texte.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Arthur, C.R., et Rigler, F.H.: A possible source of error in the ^{14}C method of measuring primary productivity. *Limnol. Oceanogr.* 12, 121–125 (1967).
- 2 Bell, R.: Thymidine incorporation rates and bacterioplankton dynamics during early spring in Lake Erken. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 19, 81–89 (1984).
- 3 Bell, W.H., et Sakshaug, E.: Bacterial utilization of algal extracellular products. 2. A kinetic study of natural populations. *Limnol. Oceanogr.* 25, 1021–1033 (1980).
- 4 Berland, B.R., Bonin, D.J., Durbec, J.P., et Maestrini, S.Y.: Bactéries hétérotrophes aérobies prélevées devant le delta du Rhône. III. Utilisation potentielle de différents substrats organiques comme source de carbone. *Hydrobiologia* 50, 3–10 (1976).
- 5 Berman, T.: Modifications in filtration methods for the measurement of inorganic ^{14}C uptake by photosynthesizing algae. *J. Phycol.* 9, 327–330 (1973).

- 6 Berman, T.: Release of dissolved organic matter by photosynthesizing algae in Lake Kinneret, Israël. *Freshwater Biol.* 6, 13–18 (1976).
- 7 Berman, T., et Kaplan, B.: Diffusion chamber studies of carbon flux from living algae to heterotrophic bacteria. *Hydrobiologia* 108, 127–134 (1984).
- 8 Blaauboer, M. C. I., van Keulen, R., et Cappenberg, Th. E.: Extracellular release of photosynthetic products by freshwater phytoplankton populations, with special reference to the algal species involved. *Freshwater Biol.* 12, 559–572 (1982).
- 9 Burney, C. M., Davis, P. G., Johnson, K. M., et McSieburgh, N.: Diel relationships of microbial trophic groups and in situ dissolved carbohydrate dynamics in the Caribbean Sea. *Mar. Biol.* 67, 311–322 (1982).
- 10 Chang, T. P.: Excretion and DOC utilization by *Oscillatoria rubescens* D.C. and its accompanying microorganisms. *Arch. Hydrobiol.* 91, 509–520 (1981).
- 11 Chrost, R. J.: Plankton photosynthesis, extracellular release and bacterial utilization of released dissolved organic carbon (RDOC) in lakes of different trophy. *Acta microbiol. polon.* 32, 275–287 (1983).
- 12 Chrost, R. J., et Faust, M. A.: Organic carbon release by phytoplankton: its composition and utilization by bacterioplankton. *J. Plankton Res.* 5 (1983).
- 13 Chrost, R. J., Siuda, W., et Wazyk, M.: Primary production, extracellular release of organic matter by phytoplankton and heterotrophic activity of bacteria in three lakes in the Mazurian Lake District, Poland. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 28, 11–18 (1981).
- 14 Collins, C. D., et Boylen, C. W.: Physiological responses of *Anabaena variabilis* (Cyanophyceae) to instantaneous exposure to various combinations of light intensity and temperature. *J. Phycol.* 18, 206–211 (1982).
- 15 Coveney, M. F.: Bacterial uptake of photosynthetic carbon from freshwater phytoplankton. *Oikos* 38, 8–20 (1982).
- 16 Fogg, G. E.: Biochemical pathways in unicellular plants. In: Cooper, J. P. (éd.): *Photosynthesis and productivity in different environments*. Cambridge University Press, London 1975.
- 17 Fogg, G. E.: Excretion of organic matter by phytoplankton a. *Comment. Limnol. Oceanogr.* 22, 567–577 (1977).
- 18 Hellebust, J. A.: Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 10, 192–206 (1965).
- 19 Herbland, A.: Influence de la dépression de filtration sur la mesure simultanée de l'assimilation et de l'excrétion organique du phytoplancton. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Oceanogr.* 12, 173–177 (1974).
- 20 Hoffle, M. G., Krambeck, C., Overbeck, J., et Witzel, K. P.: Research strategies in aquatic microbial ecology. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 19, VII–XII (1984).
- 21 Ignatiades, L., et Fogg, G. E.: Studies on the factors affecting the release of organic matter by *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve in culture. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 53, 937–956 (1973).
- 22 Itturiaga, R.: Phytoplankton photoassimilated extracellular products; heterotrophic utilization in marine environment. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* 5, 318–324 (1981).
- 23 Jensen, L. M., et Søndergaard, M.: Abiotic formation of particles from extracellular organic carbon released by phytoplankton. *Microb. Ecol.* 8, 47–54 (1982).
- 24 Jensen, L. M., Jørgensen, N. O. G., et Søndergaard, M.: Specific activity. Significance in estimating release rates of extracellular dissolved organic carbon (EOC) by algae. *Verh. int. Verein. Limnol.* 22, 2893–2897 (1985).
- 25 Jones, J. G., Simon, B. M., et Cunningham, C. R.: Bacterial uptake of algal extracellular products: an experimental approach. *J. appl. Bact.* 54, 355–365 (1983).
- 26 Jüttner, F., et Matuschek, T.: The release of low molecular weight compounds by the phytoplankton in an eutrophic lake. *Water Res.* 12, 251–255 (1977).
- 27 Kato, K.: Functional difference in the utilization of phytoplankton cell materials and dissolved organic compounds in free living and particulate-associated bacteria in an aquatic system. *Arch. Hydrobiol.* 100, 521–532 (1984).
- 28 Kuparinen, J.: Glucose assimilation: its contribution to carbon flux in the pelagial and use in monitoring heterotrophic activity. *Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol.* 19, 15–22 (1984).
- 29 Kuparinen, J., Leppänen, J. M., Sarvala, J., Sundberg, A., et Virtanen, A.: Production and utilization of organic matter in a Baltic ecosystem off Twärminne, southwest coast of Finland. *Rapp. P.V. Reun. Cons. Int. int. Explor. Mer* 183, 180–192 (1983).
- 30 Larsson, U., et Hagström, A.: Phytoplankton exudate release as an energy source for the growth of pelagic bacteria. *Mar. Biol.* 52, 199–206 (1979).

- 31 Larsson, U., et Hagström, A.: Fractionated phytoplankton primary production exudate release and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient. *Mar. Biol.* 67, 57-70 (1982).
- 32 Lugin, M.: Premières données sur les composés organiques dissous dans le bassin du lac Léman. Thèse doct. 3e cycle, Université Paris VI, 217 p. (1974).
- 33 Mague, T. H., Friberg, E., Hughes, D. J., et Morris, I.: Extracellular release of carbon by marine phytoplankton; a physiological approach. *Limnol. Oceanogr.* 25, 262-279 (1980).
- 34 Meffert, M.-E., et Overbeck, J.: Regulation of bacterial growth by algal release products. *Arch. Hydrobiol.* 87, 118-121 (1979).
- 35 Nalewajko, C.: Release of organic substances. In: Hellebust, J. A., et Craigie, J. S., (éd.): *Phycological methods*, Cambridge University Press (1978).
- 36 Nalewajko, C., Dunstall, T. G., et Shear, H.: Kinetics of extracellular release in axenic algae and in mixed algal-bacterial cultures: significance in estimation of total (Gross) phytoplankton excretion rates. *J. Phycol.* 12, 1-5 (1976).
- 37 Nalewajko, C., et Lean, D. R. S.: Growth and excretion in planktonic algae and bacteria. *J. Phycol.* 8, 361-366 (1972).
- 38 Passmann, J. M., Radin, N. S., et Cooper, J. A. D.: Liquid scintillation techniques for measuring ¹⁴C activity. *Analytical Chemistry* 28, 484-486 (1956).
- 39 Pelletier, J. P.: Essai d'évaluation de la production phytoplanktonique du lac Léman à partir de la biomasse et de l'énergie incidente. *Verh. int. Verein. Limnol.* 22, 1047-1051 (1984).
- 40 Rai, H.: Magnitude of heterotrophic metabolism of photosynthetically fixed dissolved organic carbon (PDOC) in Schöhsee, West Germany. *Arch. Hydrobiol.* 102, 91-103 (1984).
- 41 Saunders, G. W., et Storch, T. A.: Coupled oscillatory control mechanism in a planktonic system. *Nature New Biol.* 230, 58-60 (1971).
- 42 Sharp, J. H.: Excretion of organic matter by marine phytoplankton: do healthy cells do it? *Limnol. Oceanogr.* 22, 381-399 (1977).
- 43 Shimura, S., Yamaguchi, Y., Aruga, Y., Fujita, Y., et Ichimura, S.: Extracellular release of photosynthetic products by a pelagic blue-green alga, *Trichodesmium thiebautii*. *J. Oceanogr. Soc. Japan* 34, 181-188 (1978).
- 44 Smith, W. O.: The optimal procedures for the measurement of phytoplankton excretion. *Mar. Sci. Commun.* 1, 395-405 (1975).
- 45 Søndergaard, M., et Schierup, H.-H.: Release of extracellular organic carbon during a diatom bloom in Lake Mossø: molecular weight fractionation. *Freshwater Biol.* 12, 313-320 (1982).
- 46 Storch, T. A., et Saunders, G. W.: Estimating daily rates of extracellular dissolved organic carbon release by phytoplankton populations. *Int. Ver. theor. angew. Limnol. Verh.* 19, 952-958 (1975).
- 47 Storch, T. A., et Saunders, G. W.: Phytoplankton extracellular release and its relation to the seasonal cycle of dissolved organic carbon in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 23, 112-119 (1978).
- 48 Tilzer, M. M., et Horne, A. J.: Diel patterns of phytoplankton productivity and extracellular release in Ultra-Oligotrophic lake Tahoe. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 64, 157-176 (1979).
- 49 Watanabe, Y.: A study of the excretion and extracellular products of natural phytoplankton in Lake Nakanuma, Japan. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 65, 809-834 (1980).
- 50 Watt, W. D.: Release of dissolved organic material from the cells of phytoplankton populations. *Proc. Roy. Soc. London (Ser. B)* 164, 521-551 (1966).
- 51 Wiebe, W. J., et Smith, D. F.: Direct measurement of dissolved organic carbon release by phytoplankton and incorporation by microheterotrophs. *Marine Biol.* 42, 213-223 (1977).
- 52 Wolter, K.: Bacterial incorporation of organic substances released by natural phytoplankton populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 7, 287-295 (1982).
- 53 Wright, R. T., et Hobbie, J. E.: Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ecology* 47, 447-464 (1966).