

Statistisk analyse af næringsstoffers stabilitet

Notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 4. august 2016

Jacob Carstensen

Institut for Bioscience

Rekvirent:
Naturstyrelsen
Antal sider: 21

Faglig kommentering:
Henrik Fossing
Kvalitetssikring, centret:
Susanne Boutrup



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Tel.: +45 8715 0000
E-mail: dce@au.dk
<http://dce.au.dk>

Indhold

Sammenfatning	3
1 Baggrund	4
1.1 Prøver analyseret på NST's eget laboratorium	4
1.2 Prøver analyseret på andre laboratorier	5
1.3 NST spørgsmål fra projektbeskrivelsen	5
2 Statistiske analyser og resultater	6
2.1 Effekt af opbevaringstid for uorganiske næringsstoffer	6
2.2 Effekt af frysning på næringsstofkoncentrationer	10
2.3 Effekt af en måneds opbevaring på køl for silikat	12
2.4 Effekt af forskellige laboratorier	14
2.5 Effekt af opbevaringstid for TN før og efter autoklavering	17

Sammenfatning

I dette notat undersøges om opbevaringstid og opbevaringsmetode før analyse har en statistisk signifikant effekt på de målt koncentrationer af ammonium, nitrit+nitrat, fosfat, silikat og total kvælstof(TN). Endvidere undersøges, om der er væsentlig forskel på koncentrationerne målt af tre forskellige laboratorier på samtidige prøver.

De statistiske analyser af målinger foretaget i marine vandprøver på NST's laboratorium (prøver filtreret ved prøvetagning) viser, at der ikke er nogen ændring i middelkoncentrationen af ammonium, nitrit+nitrat og silikat ved opbevaring af prøverne på køl op til 36 timer før analyse. Endvidere er der ikke nogen ændring af middelkoncentrationen for silikat ved opbevaring af prøverne helt op til 4 uger på køl eller for ammonium og nitrit+nitrat ved opbevaring i fryser op til 4 uger. En længere opbevaringstid på op til 36 timer på køl påvirker således ikke indholdet af ammonium, nitrit+nitrat og silikat. Det samme gælder for ammonium og nitrit+nitrat ved opbevaring i op til 4 uger i fryser og for silikat 4 uger på køl.

Derimod steg middelkoncentrationen af fosfat med stigende opbevaringstid på køl og ved 4 ugers opbevaring i fryser. Mindst koncentrationsændring ses ved kort opbevaringstid for prøver til fosfatmåling og ved opbevaring længere end 24 timer på køl er ændringen signifikant.

Middelkoncentrationen af total kvælstof (TN) ændrede sig ikke opbevaring af prøverne med de undersøgte forskellige opbevaringstider på køl før autoklavering og ved stuetemperatur efter autoklavering. Ved opbevaring af prøver til analyse for TN i op til 36 timer før autoklavering og op til 4 uger efter autoklavering er der ikke fundet ændringer i middelniveauet.

Ved sammenligning af NST's målinger med målinger fra ALS og Eurofins blev der ikke fundet forskelle i middelkoncentrationerne for nitrit+nitrat og silikat. Derimod var målingerne af ammonium væsentlig højere for ALS og Eurofins sammenlignet med NST's målinger. For lokaliteter med høje niveauer af næringsstoffer var ALS og Eurofins målinger af fosfat og TN væsentlig lavere end NSTs målinger. De gennemførte test forklarer ikke årsagen til denne forskel.

1 Baggrund

Dette notat er udarbejdet for Naturstyrelsen, som ønsker en statistisk analyse af eventuelle forskelle i de målte koncentrationer af næringsstoffer som konsekvens af forskellig opbevaring af prøver før analyse. Til dette formål er der indsamlet vandprøver syv gange fra syv lokaliteter i perioden december 2015 til maj 2016. På en af lokaliteterne (Kerteminde Fjord) er der indsamlet vandprøver fra både top og bund af vandsøjlen, hvorimod der på de andre lokaliteter kun er indsamlet en vandprøve fra overfladen (Hjarbæk Fjord, Knebel Vig, Køge Bugt, Nyborg, Løkken og Svendborg Sund). Vandprøverne er analyseret på NST's eget laboratorium og to andre laboratorier. I det følgende afsnit vil der blive præsenteret seks konkrete spørgsmål, som NST ønsker belyst.

1.1 Prøver analyseret på NST's eget laboratorium

Hver enkelt vandprøve er opdelt i delprøver for analyse af følgende næringsstoffer: 1) nitrit + nitrat (NO_x), 2) ammonium (NH_4^+), 3) fosfat (PO_4^{3-}), 4) silikat (SiO_2) og 5) total kvælstof (TN). For de opløste næringsstoffer (1-4) er delprøven filteret umiddelbart efter prøvetagningen. Efterfølgende opbevares alle delprøver koldt (0-4 °C) indtil ankomst til laboratoriet.

Ved ankomst til NST's laboratorium er prøverne for de opløste uorganiske næringsstoffer opdelt i 8 prøvebeholdere hver med ca. 40 ml, som for hvert stof yderligere er opdelt i:

- 5 prøvebeholdere, som blev opbevaret koldt (0-4 °C) og analyseret efter henholdsvis 6, 12, 24, 30 og 36 timer.
- 1 prøvebeholder (kun silikat), som blev opbevaret koldt (0-4 °C) og analyseret efter ca. 1 måned
- 1 prøvebeholder, som blev frosset (-20 °C) indtil den blev analyseret efter ca. 1 måned.
- 1 prøvebeholder, som var reserve og blev opbevaret koldt (0-4 °C).

For prøvetagningerne i december 2015 og januar 2016 blev reserveprøven for nitrit+nitrat analyseret efter 52 timer, da der var problemer med analyserne for prøverne opbevaret 24 timer (januar) og 30 timer (december og januar).

For TN blev vandprøven opdelt i 10 prøvebeholdere hver med ca. 40 ml:

- 8 prøvebeholdere, som blev opbevaret koldt (0-4 °C) og autoklaveret efter henholdsvis 6 (4 af prøvebeholdere), 12, 24, 30 og 36 timer.
- 1 prøvebeholder, som blev frosset (-20 °C) indtil den blev analyseret efter ca. 1 måned.
- 1 prøvebeholder, som var reserve og blev opbevaret koldt indtil autoklaveret (0-4 °C).

De autoklaverede prøver opbevaredes ved stuetemperatur indtil analysen, som for 4 af prøvebeholderne (autoklaveret efter 6 timer) blev foretaget efter 1, 2, 3 og 4 uger. De andre prøver med længere tids opbevaring inden autoklaveret blev analyseret efter 3 uger.

Prøver opbevaret ved 4 °C blev klargjort til analyse kort tid før analysen og analyseret indenfor 20 min, så temperaturen i prøven forblev så lav som mu-

lig (omkring 10 °C). Frosne prøver blev tøet op ved stuetemperatur, sat på køl og analyseret hurtigt derefter.

Umiddelbart før analyse blev de enkelte delprøver vendt 5 gange for opblanding, og tre replikate målinger blev gennemført for hvert af næringsstofferne.

1.2 Prøver analyseret på andre laboratorier

Der blev også udtaget prøver til analyse på to andre laboratorier (ALS og Eurofins). Prøverne til analyse af opløste uorganiske næringsstoffer blev først filtreret efter ankomsten til disse laboratorier omkring 8 timer efter prøvetagningen. Analysen af næringsstoffer på disse laboratorier fulgte de tekniske anvisninger mht. opbevaring af prøverne.

1.3 NST spørgsmål fra projektbeskrivelsen

NST har opstillet følgende spørgsmål i projektbeskrivelsen:

Spørgsmål 1: ændres næringsstofkoncentrationen (nitrit + nitrat, ammonium, fosfat, silikat) af en forsinket analysetid på op til 36 timer? – tidstrend med flg. tidsopløsning: 6, 12, 24, 30 og 36 timer

Spørgsmål 2: kan næringsstofprøver (nitrit + nitrat, ammonium, fosfat) opbevares frosset i op til en måned inden analyse uden at koncentrationen ændres? – sammenligning af koncentrationen efter 1 måned med resultatet af 36-timers tidstrenden.

Spørgsmål 3: kan næringsstofprøver (silikat) opbevares koldt (4°C) op til en måned inden analyse uden at koncentrationen ændres? – sammenligning af koncentrationen efter 1 måned med resultatet af 36-timers tidstrenden.

Spørgsmål 4: er der forskel på koncentrationen mellem de prøver, der analyseres hos hhv. eksterne laboratorium og derfor først filteres efter modtagelsen i laboratoriet (efter omkring 8 timer) og NST-laboratoriet, hvor prøverne er filtreret umiddelbart efter indsamlingen?

Spørgsmål 5: ændres næringsstofkoncentrationen (TN) af en forsinket autoklavering på op til 36 timer? – tidstrend med flg. tidsopløsning: 6, 12, 24, 30 og 36 timer.

Spørgsmål 6: kan autoklaverede TN-prøver opbevares op til en måned ved stuetemperatur før analyse? – tidstrend med flg. tidsopløsning: 1, 2, 3 og 4 uger

2 Statistiske analyser og resultater

Indsamlingen og analysen af vandprøverne følger et traditionelt split-plot design, hvilket betyder, at der ikke er fuld randomisering for alle faktorer. Mere konkret så er der ikke randomisering på tværs af forskellige opbevaringstider, idet prøverne fra de forskellige opbevaringstider analyseres separat. De tidsmæssige faktorer i data (forskellige opbevaringstider) udgør derfor blokke (whole-plot) af målinger, som er udført samtidig. Indenfor hver af disse blokke er der målt triplikater for hver af de 7 lokaliteter (split-plot). Det antages, at prøverørene fra de 7 lokaliteter indenfor en blok er analyseret i mere eller mindre tilfældig rækkefølge, eller at de er analyseret indenfor så relativt kort tid, at der ikke optræder systematiske tidsmæssige variationer som påvirker målingerne. Opbevaringstiden af prøverne er hovedfaktor i forsøget (behandlingen), som ønskes belyst på tværs af en række lokaliteter, som spænder bredt i deres koncentrationer af næringsstoffer.

Det samlede eksperiment er foretaget 7 gange (med ca. 1 måneds interval), og disse månedlige gentagelser af eksperimentet udgør replikationen for blokke eller whole-plot. For at vurdere effekten af opbevaringstider (faktor i forsøget), skal systematiske variationer i opbevaringstiden mellem replikationer af forsøget (7 måneder) holdes op mod den tilfældige variation, som skyldes triplikatmålingerne, og den tilfældige variation, som skyldes at man måler på blokke af data til forskellige tidspunkter (blok error).

For TN er der tale om et lidt udvidet eksperiment sammenlignet med de andre analyser, idet en blok udgøres af en kombination af "antal timer inden autoklavering" og "antal uger for analyse efter autoklavering".

Alle koncentrationer angivet i $\mu\text{g l}^{-1}$ for det givne næringsstof, hvilket betyder i $\mu\text{g N l}^{-1}$ for ammonium, nitrit+nitrat og TN, $\mu\text{g P l}^{-1}$ for fosfat og $\mu\text{g Si l}^{-1}$ for silikat.

De konkrete statistiske analyser og resultater er behandlet separat for hvert spørgsmål nedenfor. Et fåtal af målinger af ammonium, nitrit+nitrat og fosfat var angivet med detektionsgrænsen for prøver analyseret på ALS og Eurofins, og af hensyn til de statistiske analyser er disse værdier erstattet med den halve detektionsgrænse. For alle de statistiske analyser gælder, at de målte koncentrationer af næringsstoffer er log-transformerede, da variationen i data stiger med koncentrationen. For at håndtere de lave og til tider negative værdier i datasættet, som optræder for ammonium, nitrit+nitrat og fosfat koncentrationer målt på NST's laboratorium, er følgende transformation anvendt for disse variable $\log(X+a)$ for alle tre laboratorier, hvor a er sat til henholdsvis $3,0 \mu\text{g l}^{-1}$, $1,0 \mu\text{g l}^{-1}$ og $1,5 \mu\text{g l}^{-1}$. Antagelsen om lognormalfordelte næringsstofkoncentrationerne understøttes af plots af middelværdi mod standardafvigelse for grupper af data, som viser en stigende standardafvigelse som funktion af middelværdien (data ikke vist her).

2.1 Effekt af opbevaringstid for uorganiske næringsstoffer

I dette afsnit undersøges om koncentrationerne af nitrit+nitrat, ammonium, fosfat og silikat ændrer sig systematisk med en øget opbevaringstid før analysen (Spørgsmål 1 i NST projektbeskrivelse). I denne analyse indgår delprøver, som har været opbevaret koldt ($0-4 \text{ }^\circ\text{C}$) i henholdsvis 6, 12, 24, 30, 36 og 52 timer (52 timer kun for nitrit+nitrat).

Opbevaringstiden kan potentielt påvirke de målte koncentrationer på to måder:

- 1) En systematisk ændring i koncentrationsniveauet med opbevaringstiden
- 2) En ændret variation mellem replikate målinger med opbevaringstiden

2.1.1 Metode

For at undersøge en potentiel systematisk ændring i koncentrationsniveauet med opbevaringstiden er de log-transformerede koncentrationer analyseret ved følgende model (små bogstaver angiver systematiske effekter og store bogstaver angiver tilfældige effekter):

$$\text{Log}(X+a) = d_i + t_j + l_k + t_j \times l_k + D_i \times T_j + D_i \times L_k + D_i \times T_j \times L_k + e_{l(ijk)}$$

hvor d_i beskriver variationen mellem datoer, t_j beskriver effekten af opbevaringstiden, l_k beskriver variationen mellem lokaliteter og $t_j \times l_k$ beskriver om effekten af opbevaringstiden ændrer sig mellem lokaliteter. De fire sidste led i modellen er tilfældige effekter, som beskriver variationer i opbevaringstiden mellem forskellige datoer ($D_i \times T_j$), variationer mellem lokaliteter for forskellige datoer ($D_i \times L_k$), variationer i opbevaringstider mellem forskellige datoer og lokaliteter ($D_i \times T_j \times L_k$) og residualvariationen (e), som angiver variationen mellem replikater.

For at undersøge en potentiel ændring i variansen på replikater er følgende model analyseret:

$$\text{Log}(X+a) = \mu_{ijk} + e_{l(ijk)},$$

hvor μ_{ijk} er middelværdien for hver enkelt sæt af triplikate målinger, $e_{l(ijk)}$ er residualvariationer mellem triplikate målinger. Det undersøges om variansen for residualvariationerne $V_{l(ijk)}$ varierer med opbevaringstiden. Den relative usikkerhed på replikater er beregnet ud fra $V_{l(ijk)}$.

2.1.2 Resultater

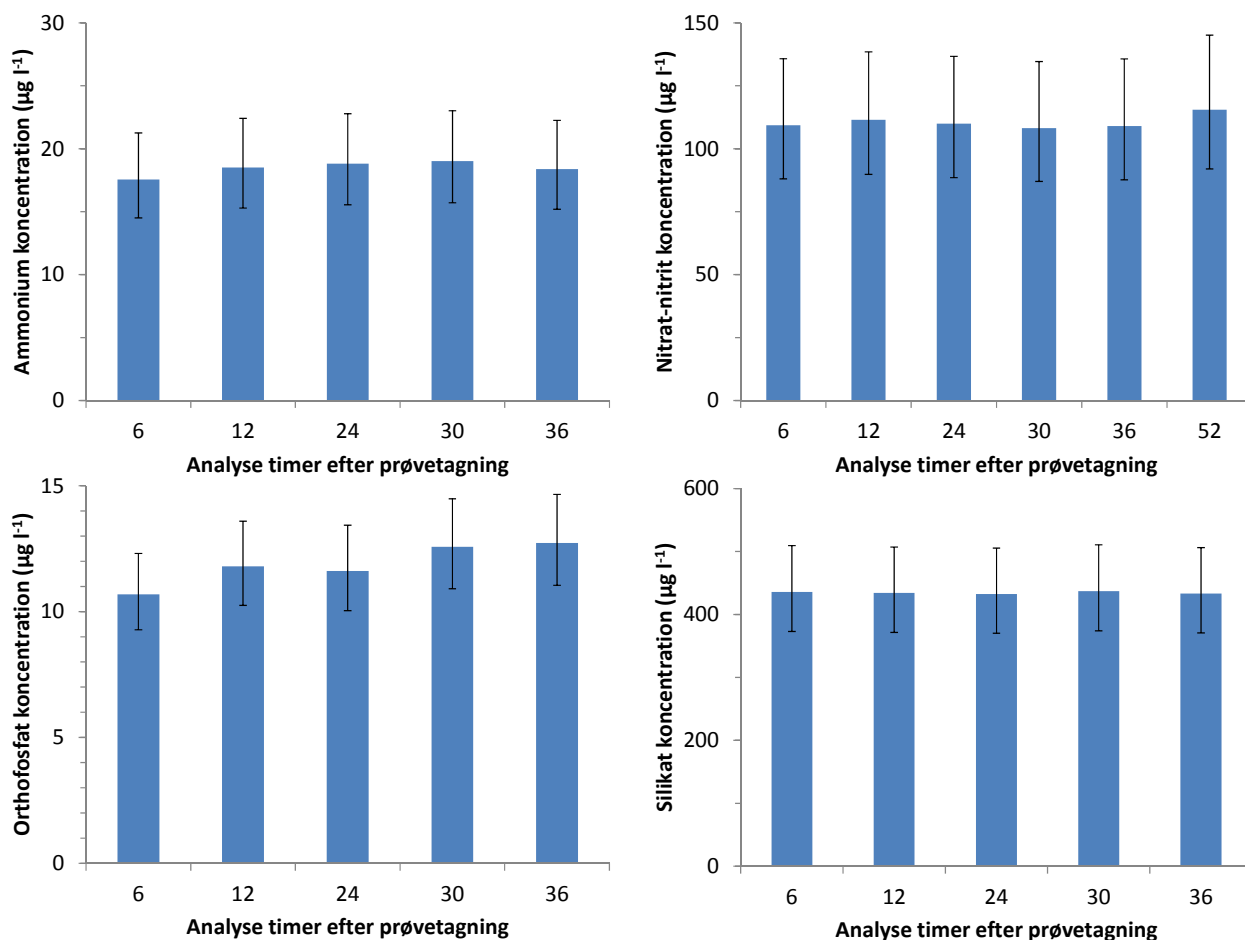
Der var (ikke overraskende) meget signifikante forskelle mellem datoerne for prøvetagning og mellem lokaliteter (Tabel 2.1). For ammonium, nitrit+nitrat og silikat var der ingen systematisk effekt af opbevaringstiden for de enkelte lokaliteter. Derimod var der både generelle og lokalitetsspecifikke systematiske effekter af opbevaringstiden for fosfat, hvilket betyder, at der var forskel i fosfatkoncentrationerne for forskellige opbevaringstider, og denne forskel var forskellig mellem lokaliteter.

Tabel 2.1. P-værdier for systematiske effekter i modellen for opløste uorganiske næringsstoffer. Signifikante effekter ($P < 0.05$) er fremhævet med grå toning. Systematiske effekter er: d_i =variation mellem dage, t_j =variation mellem opbevaringstider, l_k =variation mellem lokaliteter og $t_j \times l_k$ =variation mellem opbevaringstider for forskellige lokaliteter.

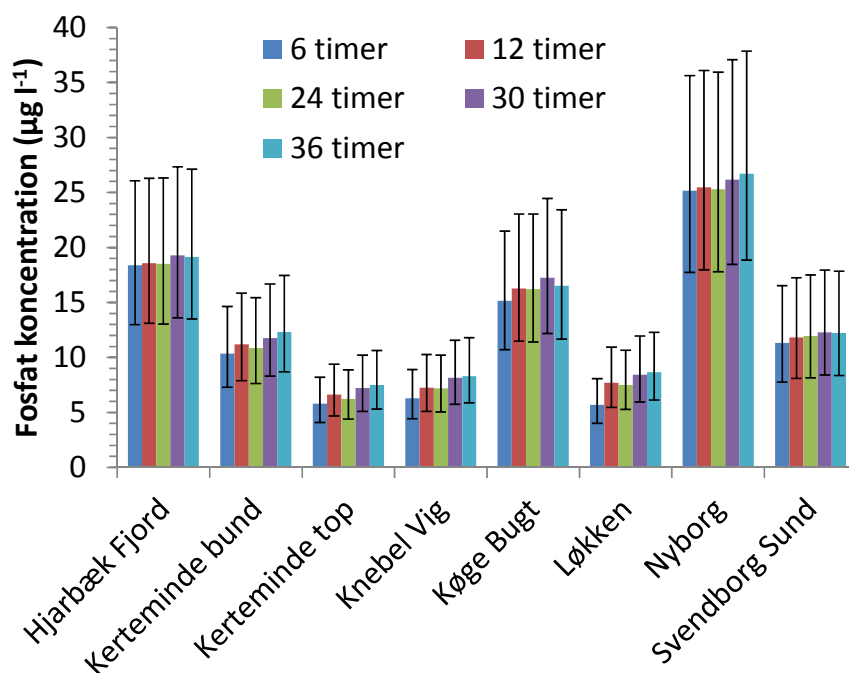
Næringsstof	d_i	t_j	l_k	$t_j \times l_k$
Ammonium	<0,0001	0,2654	<0,0001	0,1013
Nitrit+nitrat	<0,0001	0,8251	<0,0001	0,9140
Fosfat	<0,0001	0,0316	<0,0001	0,0061
Silikat	<0,0001	0,7555	<0,0001	0,3557

Disse tendenser ses tydeligt i middelniveauerne for næringsstofkoncentrationerne som funktion af opbevaringstiden (Figur 2.1). Middelniveauet var konstant omkring 18-19 $\mu\text{g l}^{-1}$ for ammonium, omkring 110 $\mu\text{g l}^{-1}$ for nitrit+nitrat, dog med en lidt højere værdi for 52 timers opbevaring (116 $\mu\text{g l}^{-1}$), og omkring 435 $\mu\text{g l}^{-1}$ for silikat. Middelniveauet for fosfat steg derimod med opbevaringstiden fra 10,7 til 12,7 $\mu\text{g l}^{-1}$, hvilket er en 19 % stigning. Der var ingen signifikant stigning fra 6 timer og op til 24 timer, hvorimod forskellen mellem 6 og 30 timers opbevaring ($P=0,0074$) og mellem 6 og 36 timers opbevaring ($P=0,0044$) viste en signifikant stigning i fosfatkoncentrationen. Stigningen fra 12 og 24 timers til 36 timers opbevaring var henholdsvis 8 % og 10 %, om end disse stigninger ikke var signifikante ($P=0,1871$ og $P=0,1294$).

Fosfatkoncentrationerne steg også konsekvent med opbevaringstiden for alle undersøgte lokaliteter (Figur 2.2), men stigningen fra 6 til 36 timer var størst for de lokaliteter med de laveste koncentrationer (30-52 % for Kerteminde top, Knebel Vig og Løkken). Derimod var den relative stigning kun 4 % og 6 % for henholdsvis Hjarbæk Fjord og Nyborg. Denne systematiske stigning indikerer et potentielt problem med længere opbevaringstider for fosfat, specielt for områder med lavere koncentrationer.

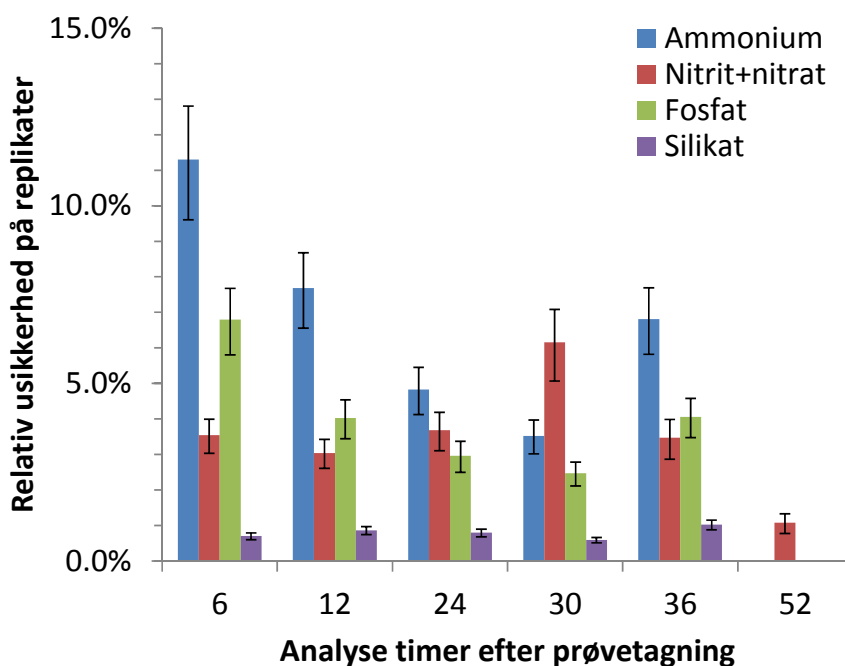


Figur 2.1. Middelværdier for alle lokaliteter samlet med 95 % konfidensgrænser for opbevaringstider fra 6 timer op til 36 timer (52 timer for nitrit+nitrat) for opløste uorganiske næringsstoffer. Enhederne er i $\mu\text{g N l}^{-1}$, $\mu\text{g P l}^{-1}$ og $\mu\text{g Si l}^{-1}$.



Figur 2.2. Middelværdier for hver af lokaliteterne med 95 % konfidensgrænser for opbevaringstider fra 6 timer op til 36 timer for fosfat (PO_4^{3-}). Enhederne er $\mu\text{g P l}^{-1}$.

Variansen på replikate målinger varierede signifikant med opbevaringstiden for alle opløste uorganiske næringsstoffer, men der var ikke noget fast mønster i de relative usikkerheder på replikate målinger (Figur 2.3). Den relative usikkerhed var 4-11 % for ammonium, 1-6 % for nitrit+nitrat, 2-7 % for fosfat og 0,5-1 % for silikat. Den lave relative usikkerhed for nitrit+nitrat for 52 timers opbevaring kan skyldes få prøver med denne opbevaringstid. Samtidig skal det bemærkes, at den relative usikkerhed er specielt stor for ammonium, da der er mange måleværdier tæt på nul, hvilket giver en relativt større usikkerhed.



Figur 2.3. Den relative usikkerhed på replikate målinger for opløste uorganiske næringsstoffer.

2.1.3 Konklusion spørgsmål 1

Der er ingen signifikant effekt af længere opbevaringstid for ammonium, nitrit+nitrat og silikat. Disse opløste uorganiske næringsstoffer kan derfor opbevares koldt i op til 36 timer uden at koncentrationsniveauet ændrer sig. Fosfatkoncentrationen stiger generelt med længere opbevaringstid, og prøverne bør højst opbevares 24 timer, men det anbefales en så kort opbevaringstid som muligt.

2.2 Effekt af frysning på næringsstofkoncentrationer

I dette afsnit undersøges om koncentrationerne af nitrit+nitrat, ammonium, og fosfat ændrer sig systematisk ved frysning i ca. en måned i forhold til opbevaring i køleskab (0-4 °C) op til 36 timer (Spørgsmål 2 i NST projektbeskrivelse). For ammonium og nitrit+nitrat er alle resultaterne fra tidstrendanalysen puljet (6, 12, 24, 30, 36 timer), hvorimod det for fosfat kun er resultaterne fra 6, 12 og 24 timer, der er puljet.

Opbevaringsmetoden kan potentielt påvirke de målte koncentrationer på to måder:

- 1) En systematisk ændring i koncentrationsniveauet med opbevaringstiden
- 2) En ændret variation mellem replikate målinger med opbevaringstiden

2.2.1 Metode

For at undersøge en potentiel systematisk ændring i koncentrationsniveauet med opbevaringstiden er de log-transformerede koncentrationer analyseret ved følgende model (små bogstaver angiver systematiske effekter og store bogstaver angiver tilfældige effekter):

$$\text{Log}(X+a) = d_i + o_j + l_k + o_j \times l_k + D_i \times O_j + D_i \times L_k + D_i \times O_j \times L_k + e_{l(ijk)}$$

hvor d_i beskriver variationen mellem datoer, o_j beskriver forskellen mellem opbevaring i køleskab og frys, l_k beskriver variationen mellem lokaliteter og $o_j \times l_k$ beskriver ændringer i opbevaringsmetoden mellem lokaliteter. De fire sidste led i modellen er tilfældige effekter, som beskriver variationer i opbevaringsmetoden mellem forskellige datoer ($D_i \times O_j$), variationer mellem lokaliteter for forskellige datoer ($D_i \times L_k$), variationen i opbevaringsmetoden mellem forskellige datoer og lokaliteter ($D_i \times O_j \times L_k$) og residualvariationen (e), som angiver variationen mellem replikater.

For at undersøge en potentiel ændring i variansen på replikater er følgende model analyseret:

$$\text{Log}(X+a) = \mu_{ijk} + e_{l(ijk)},$$

hvor μ_{ijk} er middelværdien for hver enkelt sæt af triplikate målinger, $e_{l(ijk)}$ er residualvariationer mellem triplikate målinger. Det undersøges om variansen for residualvariationerne $V_{l(ijk)}$ varierer med opbevaringstiden. Den relative usikkerhed på replikater er beregnet ud fra $V_{l(ijk)}$.

2.2.2 Resultater

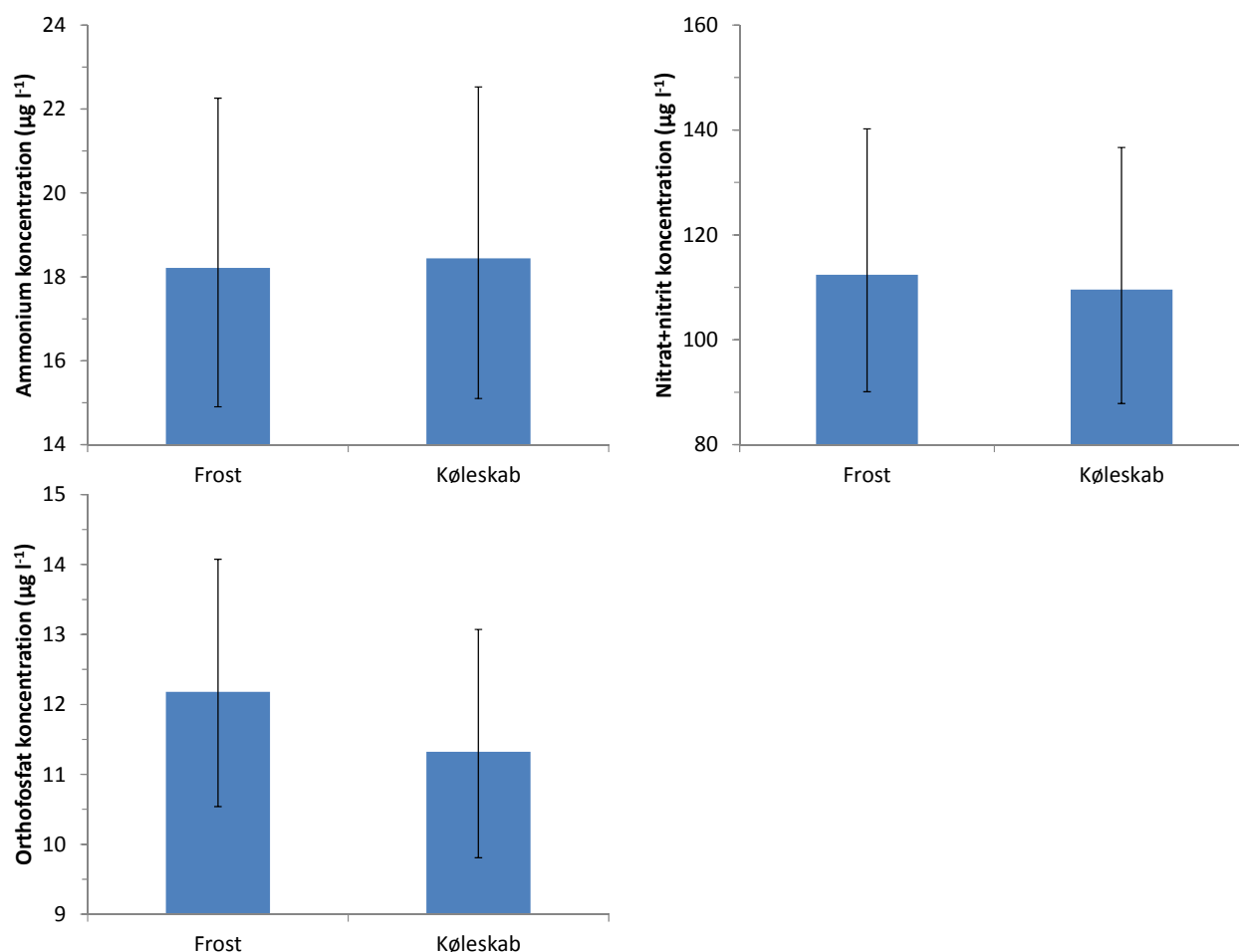
Som for analysen ovenfor var der meget signifikante forskelle mellem datoerne for prøvetagning og mellem lokaliteter (Tabel 2.2). Derimod var der in-

gen effekt af opbevaringsmetoden (køl/frys), hverken generelt eller specifikt for nogle af lokaliteterne. De små og ikke-signifikante forskelle mellem de to opbevaringsmetoder ses også tydeligt af middelværdierne (Figur 2.4).

Tabel 2.2. P-værdier for systematiske effekter i modellen for opløste uorganiske næringsstoffer. Signifikante effekter ($P < 0.05$) er fremhævet med grå toning. Systematiske effekter er: d_i =variation mellem dage, t_j =variation mellem opbevaringstider, l_k =variation mellem lokaliteter og $t_j \times l_k$ =variation mellem opbevaringstider for forskellige lokaliteter.

Næringsstof	d_i	t_j	l_k	$t_j \times l_k$
Ammonium	<0,0001	0,8145	<0,0001	0,6793
Nitrit+nitrat	<0,0001	0,6093	<0,0001	0,8149
Fosfat	<0,0001	0,2503	<0,0001	0,3257

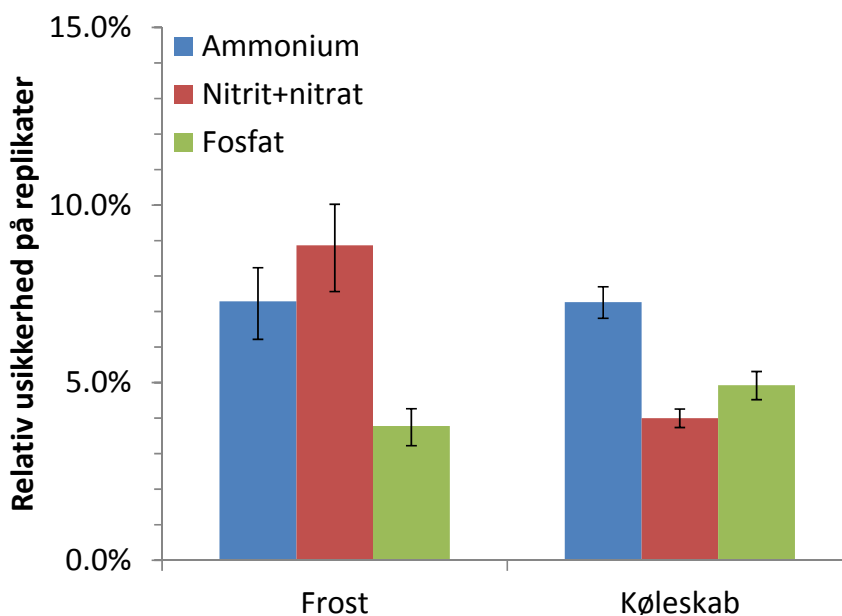
Det er dog værd at bemærke, at koncentrationen i de frosne fosfatprøver var noget højere end prøverne på køl. Da fosfatprøverne viste stigende koncentrationer med opbevaringstiden, er det derfor relevant at undersøge, om der er forskel på prøverne med 6 timers køl og frysning. Ved anvendelse af samme model (kun prøver fra 6 timers opbevaring i køleskab og 4 ugers frost) blev der ikke fundet nogen generel forskel i opbevaringsmetode ($P=0,2146$) eller specifik for lokaliteter ($P=0,1435$). Fosfatkoncentrationen i de frosne prøver var 14 % højere end prøverne med 6 timers opbevaring i køleskab. Fosfatkoncentrationen på frost var derfor lavere end prøver opbevaret på køl i 30 og 36 timer. Ved sammenligning af prøverne med 12 timers køl og frysning var der ingen generel forskel i opbevaringsmetode ($P=0,4595$), ligesom der heller ikke var det ved sammenligning af prøverne med 24 timers køl og frysning ($P=0,7234$).



Figur 2.4. Middelværdier for alle lokaliteter samlet med 95 % konfidensgrænser for opbevaring på køl og frost for ammonium,

nitrit+nitrat og fosfat. Køleskabsprøverne (6, 12 og 24 timer) er puljede fra tidstrendsanalysen (se metodebeskrivelse). Enhederne er i $\mu\text{g N l}^{-1}$ og $\mu\text{g P l}^{-1}$.

Variansen på replikate målinger ændrede sig ikke mellem køleskab og frost for ammonium, som for begge opbevaringsmetoder var omkring 7 %. Derimod udviste nitrit+nitrat en større variation i frostprøverne (9 %) end prøverne på køl (4 %), hvorimod det modsatte mønster gjorde sig gældende for fosfat (Figur 2.5).



Figur 2.5. Den relative usikkerhed på replikate målinger for ammonium, nitrit+nitrat og fosfat.

2.2.3 Konklusion spørgsmål 2

Der er ingen signifikant forskel på om opbevaring af prøverne for ammonium og nitrit+nitrat sker i henholdsvis fryser og køleskab. Dog tyder en 14 % højere fosfatkoncentration for prøver, som har været opbevaret på frost ca. en måned, på en svag ændring af prøvens indhold. Prøver til analyse for ammonium og nitrit+nitrat kan derfor godt fryses uden at koncentrationsniveauet ændrer sig, hvorimod prøver til fosfatbestemmelse bør opbevares på køl så kort tid som muligt, hvis det skal sikres, at der ikke sker ændringer i indholdet.

2.3 Effekt af en måneds opbevaring på køl for silikat

I dette afsnit undersøges, om silikat koncentrationerne ændrer sig systematisk ved opbevaring i køleskab (0-4 °C) fra 36 timer til ca. 4 uger (Spørgsmål 3 i NST projektbeskrivelse). Til denne analyse benyttes kun silikatprøver som er opbevaret i henholdsvis 36 timer og 4 uger på køl.

Opbevaringsmetoden kan potentielt påvirke de målte koncentrationer på to måder:

- 1) En systematisk ændring i koncentrationsniveauet med opbevaringstiden
- 2) En ændret variation mellem replikate målinger med opbevaringstiden

2.3.1 Metode

For at undersøge en potentiel systematisk ændring i koncentrationsniveauet med opbevaringstiden er de log-transformerede koncentrationer analyseret ved følgende model (små bogstaver angiver systematiske effekter og store bogstaver angiver tilfældige effekter):

$$\text{Log}(X+a) = d_i + t_j + l_k + t_j \times l_k + D_i \times T_j + D_i \times L_k + D_i \times T_j \times L_k + e_{l(ijk)}$$

hvor d_i beskriver variationen mellem datoer, t_j beskriver forskellen mellem opbevaring 36 timer og 4 uger i køleskab, l_k beskriver variationen mellem lokaliteter og $t_j \times l_k$ beskriver forskellen i opbevaring mellem lokaliteter. De fire sidste led i modellen er tilfældige effekter, som beskriver variationer i opbevaringsmetoden mellem forskellige datoer ($D_i \times T_j$), variationer mellem lokaliteter for forskellige datoer ($D_i \times L_k$), variationen i opbevaringsmetoden mellem forskellige datoer og lokaliteter ($D_i \times T_j \times L_k$) og residualvariationen (e), som angiver variationen mellem replikater.

For at undersøge en potentiel ændring i variansen på replikater er følgende model analyseret:

$$\text{Log}(X+a) = \mu_{ijk} + e_{l(ijk)}$$

hvor μ_{ijk} er middelværdien for hver enkelt sæt af triplikate målinger, $e_{l(ijk)}$ er residualvariationer mellem triplikate målinger. Det undersøges om variansen for residualvariationerne $V_{l(ijk)}$ varierer med opbevaringstiden. Den relative usikkerhed på replikater er beregnet ud fra $V_{l(ijk)}$.

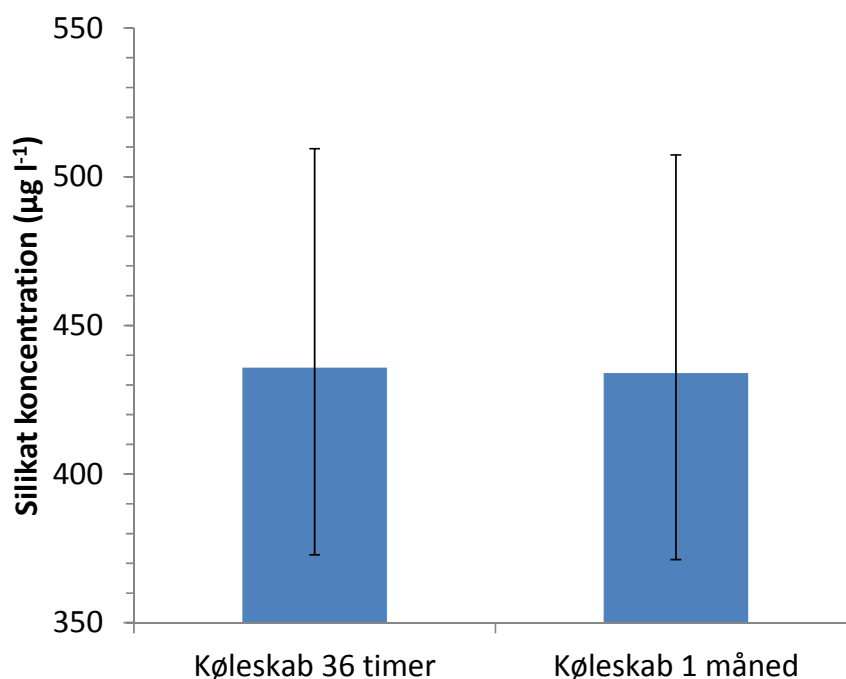
2.3.2 Resultater

Der var ingen signifikant forskel i silikatkoncentrationen mellem prøver opbevaret 36 timer og 4 uger på køl (Tabel 2.3). Den lille forskel mellem de to opbevaringer er ligeledes tydelig for afbildede middelværdier (Figur 2.6).

Tabel 2.3. P-værdier for systematiske effekter i modellen for opbevaring af prøver til silikatanalyse på køl i henholdsvis 36 timer og 4 uger. Signifikante effekter ($P < 0.05$) er fremhævet med grå toning. Systematiske effekter er: d_i =variation mellem dage, t_j =variation mellem opbevaringstider, l_k =variation mellem lokaliteter og $t_j \times l_k$ =variation mellem opbevaringstider for forskellige lokaliteter.

Næringsstof	d_i	t_j	l_k	$t_j \times l_k$
Silikat	<0,0001	0,9224	<0,0001	0,8547

Der var signifikant forskel i variansen mellem replikate målinger, hvor den relative usikkerhed for prøver på køl 4 uger (1,3 %) var lidt større end den relative usikkerhed for prøver på køl 36 timer (0,8 %).



Figur 2.6. Middelkoncentrationen af silikat for alle lokaliteter samlet med 95 % konfidensgrænser for henholdsvis 36 timers og 4 ugers opbevaring på køl. Enheden er $\mu\text{g Si l}^{-1}$.

2.3.3 Konklusion spørgsmål 3

Der er ingen signifikant forskel mellem 36 timers og 4 ugers opbevaring på køl af prøver for silikat. Prøver til analyse for silikat kan derfor godt opbevares 4 uger uden at det påvirker middelkoncentrationen.

2.4 Effekt af forskellige laboratorier

I dette afsnit undersøges, om der er signifikant forskel på de næringsstofkoncentrationer, som måles på NST's laboratorium sammenholdt med prøver analyseret efter standardmetoder på analyselaboratorierne ALS og Eurofins. For prøverne fra ALS og Eurofins er der kun indberettet middelværdier over tripliktmålinger. Derfor er NST's data ligeledes puljet som middelværdier over de tre replikate målinger. Endvidere sammenholdes alle NST data fra tidstrendanalysen (prøver på køl) op til 36 timer, dog kun op til 24 timer for fosfat (se konklusion på Spørgsmål 1 ovenfor), med målingerne fra de to analyselaboratorier.

Med udgangspunkt i dette datasæt undersøges:

- 1) om der er generel forskel på middelniveauet for næringsstoffer (ammonium, nitrit+nitrat, fosfat, silikat og TN) målt på de tre forskellige laboratorier
- 2) om en eventuel forskel mellem laboratorier varierer mellem lokaliteter
- 3) hvis der er forskel, hvori består forskellen mellem de forskellige laboratorier

2.4.1 Metode

For at undersøge en potentiel systematisk ændring i koncentrationsniveauet mellem laboratorier er de log-transformerede koncentrationer analyseret ved

følgende model (små bogstaver angiver systematiske effekter og store bogstaver angiver tilfældige effekter):

$$\text{Log}(X+a) = d_i + a_j + l_k + a_j \times l_k + D_i \times A_j + D_i \times L_k + D_i \times A_j \times L_k + e_{l(ijk)}$$

hvor d_i beskriver variationen mellem datoer, a_j beskriver forskellen mellem laboratorier, l_k beskriver variationen mellem lokaliteter og $a_j \times l_k$ beskriver om forskellen mellem laboratorier varierer mellem lokaliteter. De fire sidste led i modellen er tilfældige effekter, som beskriver forskelle mellem laboratorier for forskellige datoer ($D_i \times A_j$), variationer mellem lokaliteter for forskellige datoer ($D_i \times L_k$), variationen mellem laboratorier for forskellige datoer og lokaliteter ($D_i \times T_j \times L_k$) og residualvariationen (e).

2.4.2 Resultater

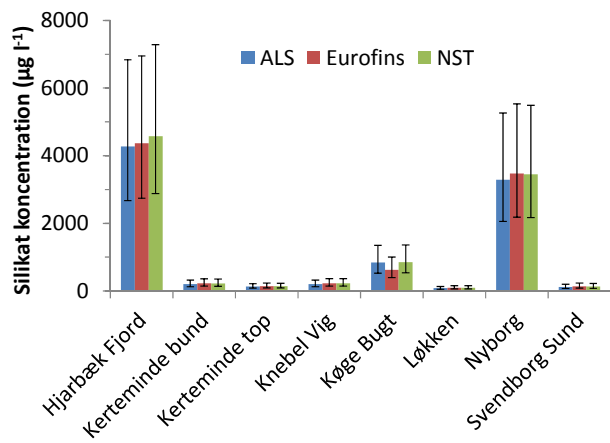
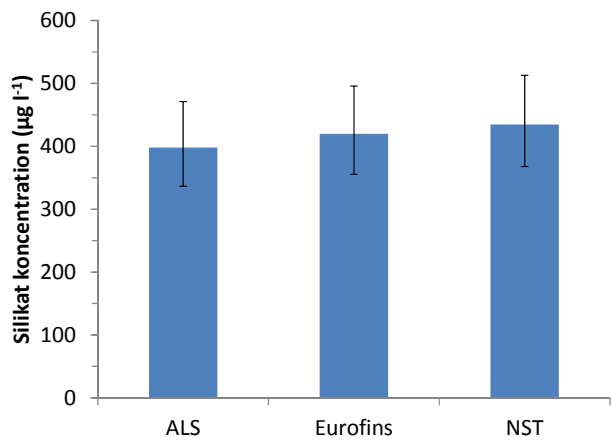
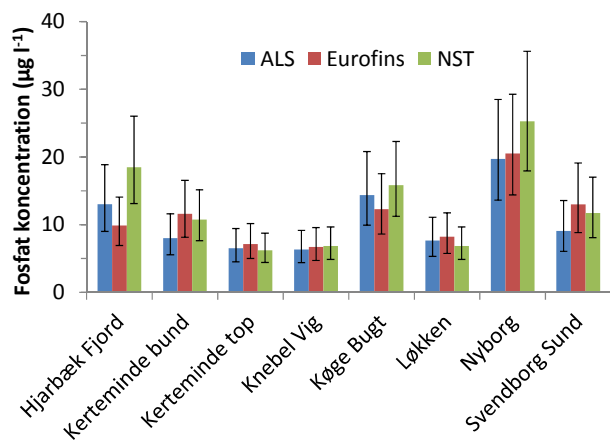
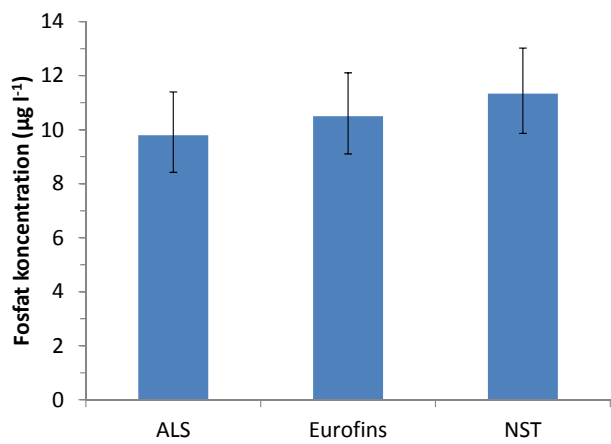
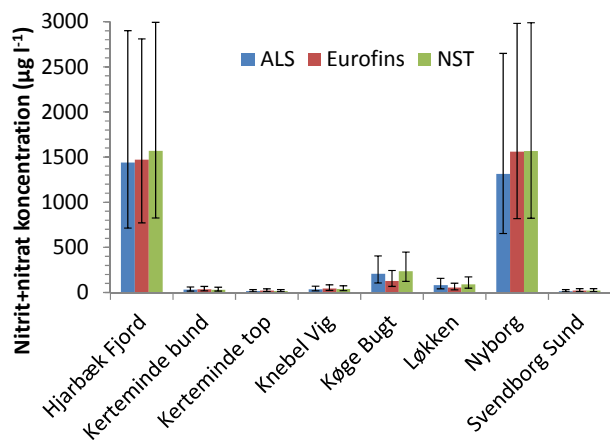
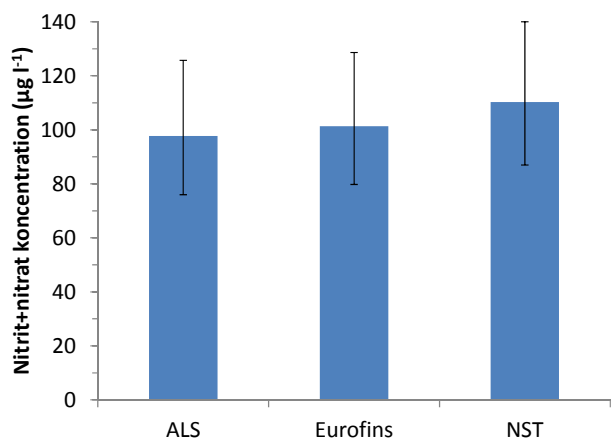
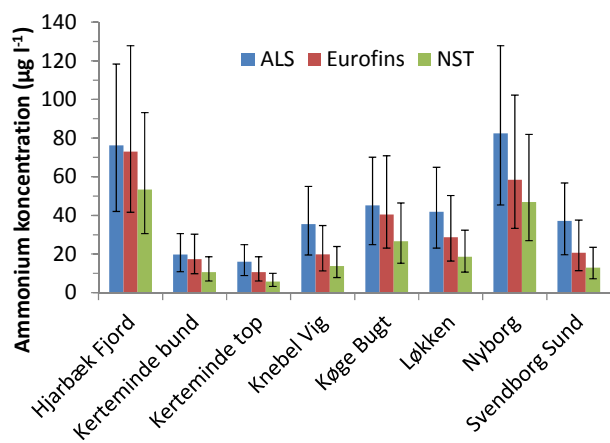
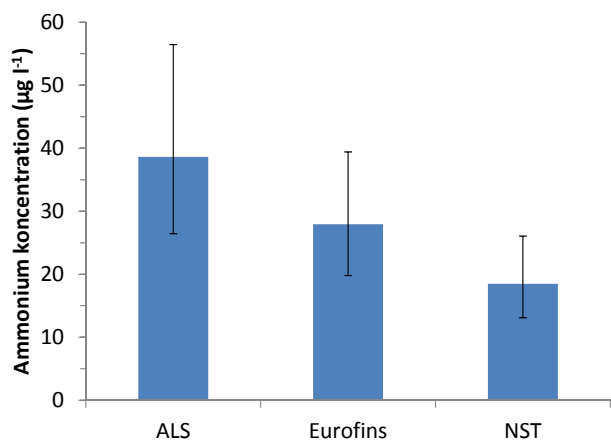
Der var meget signifikante forskelle mellem datoerne for prøvetagning og mellem lokaliteter (Tabel 2.4). For nitrit+nitrat og silikat var der ingen systematisk forskel mellem laboratorier.

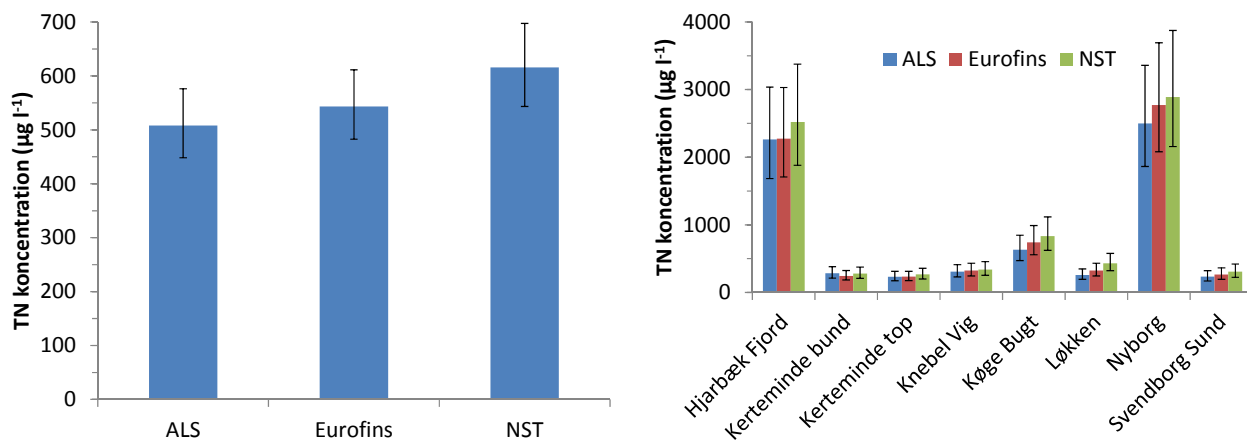
Tabel 2.4. P-værdier for systematiske effekter i modellen for næringsstoffer målt på forskellige laboratorier. Signifikante effekter ($P < 0.05$) er fremhævet med grå toning. Systematiske effekter er: d_i =variation mellem dage, a_j =variation mellem analyselaboratorier, l_k =variation mellem lokaliteter og $a_j \times l_k$ =variation mellem analyselaboratorier for forskellige lokaliteter.

Næringsstof	d_i	a_j	l_k	$a_j \times l_k$
Ammonium	0,0085	0,0330	<0,0001	0,6361
Nitrit+nitrat	<0,0001	0,5265	<0,0001	0,4773
Fosfat	<0,0001	0,1918	<0,0001	0,0062
Silikat	<0,0001	0,1069	<0,0001	0,3155
TN	0,0016	0,0196	<0,0001	0,0094

For ammonium var der en generel systematisk forskel mellem laboratorierne, idet ALS i middel målte mere end dobbelt så høje koncentrationer som NST (109 %) og Eurofins målte 51 % højere koncentrationer (Figur 2.7). Disse forskelle var konsistente for alle lokaliteter. Det er sandsynligt at de højere koncentrationer skyldes, at vandprøverne analyseret af ALS og Eurofins først er filtreret efter ankomst til laboratoriet omkring 8 timer efter prøvetagning, og at der derfor kan have været frigivelse af ammonium fra partikulært organisk stof under opbevaringen.

For fosfat var der ingen generel systematisk forskel, men der var lokalitetsspecifikke forskelle mellem laboratorier (Tabel 2.4). Dette forhold ses tydeligst ved, at der for lokaliteter med lave fosfatniveauer ikke er forskel mellem laboratorier, hvorimod NST middelniveauerne er noget højere for lokaliteter med høje middelniveauer (Figur 2.7). Afklaring af årsagen til denne forskel ligger underfor projektets rammer.





Figur 2.7. Middelkoncentrationer med 95 % konfidensgrænser målt af tre forskellige laboratorier for næringsstoffer. Til venstre er afbildet middelkoncentrationen for alle lokaliteter samlet og til højre er afbildet middelkoncentrationer specifikt for de enkelte lokaliteter. Enhederne er i $\mu\text{g N l}^{-1}$, $\mu\text{g P l}^{-1}$ og $\mu\text{g Si l}^{-1}$.

Endelig var der signifikant forskel mellem laboratorier for TN koncentrationerne, og disse forskelle var desuden forskellige mellem lokaliteter. Generelt var TN koncentrationerne fra ALS og Eurofins henholdsvis 17 % og 12 % lavere end NST's målinger (Figur 2.7). Denne forskel var mere markant for lokaliteter med høje TN koncentrationer og mindre markant for lokaliteter med lave TN koncentrationer. Årsagen til denne forskel vides ikke.

2.4.3 Konklusion spørgsmål 4

Der er ingen signifikant forskel mellem laboratorierne for målinger af nitrit+nitrat og silikat. Derimod er målingerne af ammonium væsentlig højere for ALS og Eurofins sammenlignet med NST's målinger. For lokaliteter med høje niveauer af næringsstoffer fandt ALS og Eurofins væsentligt lavere indhold af fosfat og TN end NST. Det er ikke indenfor projektets rammer muligt at afklare årsagen til denne forskel.

2.5 Effekt af opbevaringstid for TN før og efter autoklaving

I dette afsnit undersøges om TN koncentrationerne ændrer sig systematisk for forskellige opbevaringstider på køl (0-4 °C) før autoklaving (6, 12, 24, 30 og 36 timer) (Spørgsmål 5 i NST projektbeskrivelse) og forskellige opbevaringstider ved stuetemperatur efter autoklaving (1, 2, 3 og 4 uger) (Spørgsmål 6 i NST projektbeskrivelse). Begge spørgsmål vedrørende opbevaring af prøver for TN analyser besvares i det følgende med den samme model.

Opbevaringstiderne før og efter autoklaving kan potentielt påvirke de målte koncentrationer på to måder:

- 1) En systematisk ændring i koncentrationsniveauet med opbevaringstiden på køl før autoklaving
- 2) En systematisk ændring i koncentrationsniveauet med opbevaringstiden efter autoklaving
- 3) En ændret variation mellem replikate målinger med opbevaringstiden på køl før autoklaving
- 4) En ændret variation mellem replikate målinger med opbevaringstiden efter autoklaving

2.5.1 Metode

For at øge styrken i analysen undersøges effekten af opbevaringstid før og efter autoklavering med den samme model. Da der kun er foretaget analyser med forskellig opbevaring før autoklavering for efterfølgende opbevaring ved stuetemperatur i 3 uger, og tilsvarende kun er foretaget analyser med varierende opbevaring efter autoklavering med 6 timers opbevaring på køl inden autoklavering, er det ikke muligt at undersøge potentielle interaktioner mellem opbevaringen før og efter autoklavering. De log-transformerede koncentrationer er analyseret ved følgende model (små bogstaver angiver systematiske effekter og store bogstaver angiver tilfældige effekter):

$$\begin{aligned} \text{Log}(X+a) = & d_i + t_j + l_k + t_j \times l_k + u_1 + u_1 \times l_k \\ & + D_i \times T_j + D_i \times L_k + D_i \times T_j \times L_k + D_i \times U_1 + D_i \times U_1 \times L_k + e_{m(ijkl)} \end{aligned}$$

hvor d_i beskriver variationen mellem datoer, t_j beskriver variationen som følge af forskellige timers opbevaringstider i køleskab før autoklavering, l_k beskriver variationen mellem lokaliteter og u_1 beskriver variationen som følge af forskellige ugers opbevaring efter autoklavering. Interaktionerne $t_j \times l_k$ og $u_1 \times l_k$ beskriver om effekterne af opbevaringstid varierer mellem lokaliteter. De seks sidste led i modellen er tilfældige effekter, som beskriver variationer i opbevaringsmetoden før autoklavering mellem forskellige datoer ($D_i \times T_j$), variationer mellem lokaliteter for forskellige datoer ($D_i \times L_k$), variationer i opbevaringsmetoden før autoklavering mellem forskellige datoer og lokaliteter ($D_i \times T_j \times L_k$), variationer i opbevaringsmetoden efter autoklavering mellem forskellige datoer ($D_i \times U_1$), variationer i opbevaringsmetoden efter autoklavering mellem forskellige datoer og lokaliteter ($D_i \times U_1 \times L_k$) og residualvariationer (e), som angiver variationen mellem replikater.

For at undersøge en potentiel ændring i variansen på replikater er følgende generelle model analyseret:

$$\text{Log}(X+a) = \mu_{ijk} + e_{l(ijk)},$$

hvor μ_{ijk} er middelværdien for hver enkelt sæt af triplikate målinger, $e_{l(ijk)}$ er residualvariationer mellem triplikate målinger. Det undersøges om variansen for residualvariationerne $V_{l(ijk)}$ varierer med opbevaringstiden før og efter autoklavering. Den relative usikkerhed på replikater er beregnet ud fra $V_{l(ijk)}$.

2.5.2 Resultater

Som forventet var der signifikante variationer mellem datoer for prøvetagninger og mellem lokaliteter (Tabel 2.5). Derimod var der ingen signifikant effekt af hverken opbevaringstiden på køl før autoklavering eller opbevaringstiden i stuetemperatur efter autoklavering. Dette mønster var generelt for alle lokaliteter, idet der ikke var nogen signifikant effekt af interaktionen mellem opbevaringstider og lokalitet.

Tabel 2.5. P-værdier for systematiske effekter i modellen for opbevaringstider af TN prøver før og efter autoklavering. Signifikante effekter ($P < 0.05$) er fremhævet med grå toning. Signifikante effekter ($P < 0.05$) er fremhævet med grå toning. Systematiske effekter er: d_i =variation mellem dage, t_j =variation mellem opbevaringstider for autoklavering, l_k =variation mellem lokaliteter og $t_j \times l_k$ =variation mellem opbevaringstider før autoklavering for forskellige lokaliteter, u_1 =variation mellem opbevaringstider efter autoklavering og

$u_i \times I_k$ = variation mellem opbevaringstider efter autoklavering for forskellige lokaliteter.

Næringsstof	d_i	t_j	I_k	$t_j \times I_k$	u_i	$u_i \times I_k$
TN	0,0011	0,3589	<0,0001	0,6081	0,2890	0,7214

TN middelmålinger varierede fra 594 op til 609 $\mu\text{g l}^{-1}$ for de forskellige opbevaringstider før autoklavering uden nogen speciel systematik (Figure 2.8). Det samme gjorde sig gældende for TN middelmålinger for forskellige opbevaringstider efter autoklavering, som varierede fra 597 til 609 $\mu\text{g l}^{-1}$.

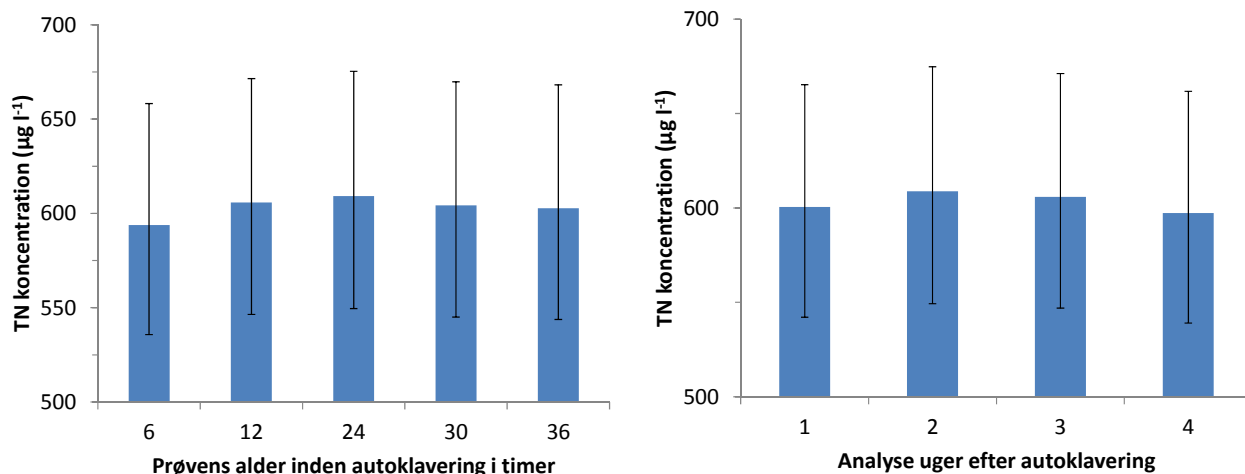


Figure 2.8. TN middelmålinger med 95 % konfidensgrænser for forskellige opbevaringstider før og efter autoklavering. Enheden er $\mu\text{g N l}^{-1}$.

Den relative usikkerhed på replikate TN målinger var ganske lille ($\sim 0,5\%$), og der var ikke signifikant forskel mellem de relative usikkerheder for forskellige opbevaringstider før autoklavering, hvorimod der var signifikant forskel mellem forskellige opbevaringstider efter autoklavering (Figure 2.9).

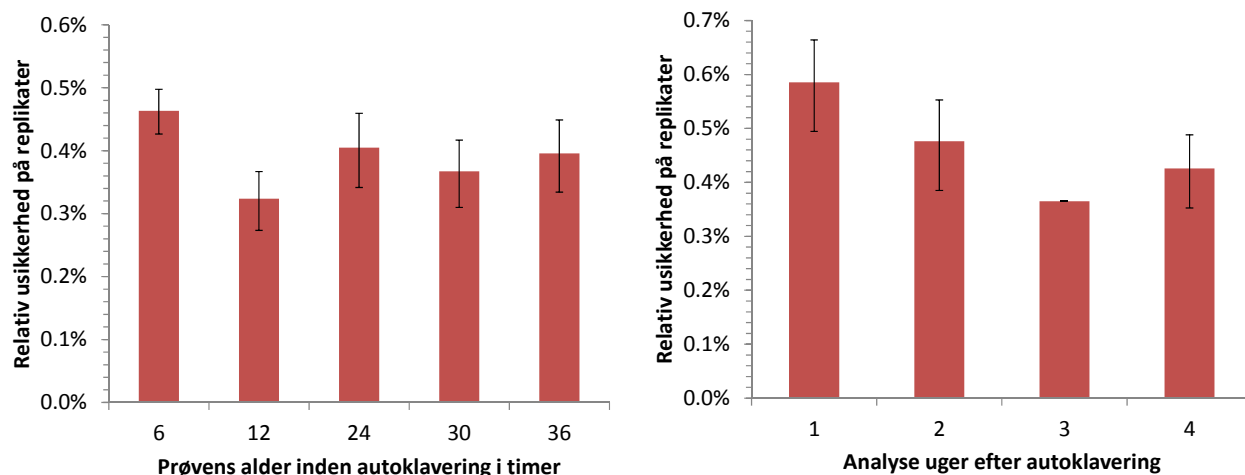


Figure 2.9. Den relative usikkerhed på replikate målinger af TN for forskellige opbevaringstider før og efter autoklavering.

2.5.3 Konklusion spørgsmål 5 og 6

Der er ikke signifikant forskel mellem forskellige opbevaringstider på køl før autoklavering af TN prøver og ikke signifikant forskel mellem forskellige opbevaringstider ved stuetemperatur efter autoklavering. Prøver til analyse for TN kan derfor godt opbevares op til 36 timer før autoklavering og op til 4 uger efter autoklavering uden at middelniveauet ændrer sig.