

Bestemmelse af forskelle mellem oxidationsmetoder for målinger af total kvælstof i marine prøver

Fagligt notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 13. januar 2020 | 67



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Datablad

Fagligt notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

Kategori: Rådgivningsnotat

Titel: Bestemmelse af forskelle mellem oxidationsmetoder for målinger af total kvælstof i marine prøver

Forfatter: Jacob Carstensen
Institution: Institut for Bioscience

Faglig kommentering: Martin M. Larsen & Jesper Christensen, Institut for Bioscience
Kvalitetssikring, DCE: Signe Jung-Madsen

Rekvirent: Miljøstyrelsen

Bedes citeret: Carstensen, J. 2020. Bestemmelse af forskelle mellem oxidationsmetoder for målinger af total kvælstof i marine prøver. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 26 s. - Fagligt notat nr. 2020|67
https://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notatet_2020/N2020_67.pdf

Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse

Sideantal: 26

Indhold

Sammenfatning	4
1 Introduktion og problemstilling	5
2 Datagrundlag og statistiske analyser	7
2.1 Datagrundlag	7
2.2 Statistisk analyse	8
3 Resultater og diskussion	11
3.1 Sæsonmæssige variationer	11
3.2 Empiriske relationer til korrektion af UV-målinger	15
3.3 Metode for korrektion af TN-målinger med UV-oxidation	19
3.4 Konsekvenser for trendanalyser	21
4 Sammenfattende konklusioner og anbefaling	23
5 Referencer	24
Bilag 1	26

Sammenfatning

Igennem en årrække er vandprøver indsamlet i forbindelse med overvågningsprogrammet blevet analyseret for mængden af total kvælstof ved anvendelse af UV-bestråling til oxidation af det organiske materiale. UV-behandlingen har vist sig at være mindre effektivt til at oxidere alt organisk kvælstof sammenlignet med autoklave-oxidation. Derfor har Miljøstyrelsen indsamlet 778 vandprøver, som er undersøgt parallelt med både UV- og autoklave-oxidation, over 12 måneder med henblik på at opstille formler til korrektion af TN-målinger udført med UV-oxidation. Dette notat omhandler den statistiske analyse af disse målinger og anviser korrektionsfaktorer, som kan kompensere for den mindre effektivitet af UV-behandlingen.

Forholdet mellem TN målt med henholdsvis UV- og autoklave-oxidation varierer sæsonmæssigt med størst forskel om sommeren og mindre om vinteren. Desuden er UV-oxidationen mindre effektiv, når mængden af alger, målt som klorofyl a, stiger. Derimod er der ikke fundet nogen signifikant afhængighed af salinitet eller dybde, hvilket indikerer, at vandmassens ophav og UV-eksponering i overfladen har en mindre betydning for effektiviteten af UV-oxidation i forhold til autoklave-oxidation. Desuden er UV-oxidation mindre effektiv for vandprøver fra fjorde og kyster, hvilket kan skyldes en større mængde partikulært materiale i disse prøver.

Det vurderes, at det er muligt at rekonstruere TN-observationer fra historiske vandprøver i den nationale database, som er analyseret med UV-behandling, så de svarer til en TN-koncentration målt med autoklave-oxidation. Usikkerheden i disse formler er på niveau med den accepterede måleusikkerhed for TN-prøver. Det anbefales, at de etablerede formler benyttes til at korrigere TN-målinger i den nationale database, som er målt med UV-oxidation.

1 Introduktion og problemstilling

Størstedelen af kvælstoftilførslen fra land og atmosfære kommer som uorganisk kvælstof, hvorimod en stor del af kvælstofkoncentrationen i havet er organisk. Dette skyldes hovedsageligt, at det uorganiske kvælstof bliver optaget og omsat til organisk kvælstof af alger. Kvælstofkoncentrationerne kan hurtigt ændres mellem uorganiske og organisk former ved biologisk optag og remineralisering. Derfor er det vigtigt at kende den totale mængde af kvælstof, når kvælstofkoncentrationer i havet skal sammenlignes med tilførsler fra land.

Marine vandprøver indeholder kvælstof i uorganisk og organisk form. De uorganiske former kan relativt nemt måles. For kvælstof er det hovedsageligt ammonium, nitrit og nitrat. Summen af disse benævnes DIN-koncentrationen efter den engelske forkortelse for 'dissolved inorganic nitrogen'. De organiske forbindelser kan være i opløst eller partikulær form, og nedbrydeligheden af disse forbindelser er meget variabel. Endvidere kan kvælstof være adsorberet til overfladen af uorganiske partikler. Organisk bundet kvælstof er vanskeligt at måle, og standardmetoden for disse stoffer har derfor i mange år været, at man oxiderer (ilter) alt organisk stof, således at alt kvælstof kommer over på nitratform. Derefter analyseres prøverne for nitrat, og resultatet benævnes total kvælstof (TN). Den oprindelige organisk bundne fraktion (ON) kan beregnes som forskellen mellem den oprindelige DIN-koncentration og TN-koncentrationerne i prøven. En sand måling af TN kræver en fuldstændig oxidation af ON. Det er i praksis ikke muligt, og TN-koncentrationen repræsenterer derfor altid et minimumsestimater. I de fleste prøver, og med en korrekt gennemført oxidation, kan man dog normalt nå bestemmelser, som er tæt på de sande værdier.

Der findes forskellige metoder til oxidation, men i praksis har to været anvendt: oxidation ved opvarmning med et oxidationsmiddel (autoklavemetode) og oxidation ved bestråling med ultraviolet lys (UV-metode). Ved opvarmning med oxidationsmiddel kan man opnå en meget effektiv oxidation, specielt ved at anvende skrappe oxidationsmidler, lang tid og høj temperatur. For UV-metoden gælder, at den virker ved dels at excitere organiske stoffer, som absorberer lys i UV-området, så molekylerne går i stykker, og dels ved at der dannes frie iltradikaler, når vand UV-bestråles, som så oxiderer de organiske stoffer. Endvidere kan man også ved UV-metoden tilsætte et oxidationsmiddel. For UV-metoden gælder ligeledes, at tid og intensitet af behandling påvirker effektiviteten af oxidationen.

For begge metoder gælder, at en effektiv oxidation kan forøge omkostningerne, når analysen gennemføres i praksis (Eurofins 2014). Analyselaboratorier har derfor en udfordring i at reducere analyseomkostninger og dermed prisen, uden at det påvirker effektiviteten af oxidationen og dermed analysens kvalitet.

Effektiviteten af oxidationen afhænger af de typer af organiske stoffer, som kvælstof er bundet til. Det spænder fra let nedbrydelige stoffer som aminosyrer og sukkerstoffer til komplekse humusforbindelser. Endvidere er det sådan, at organiske stoffer i søer, men især i havet, naturligt er udsat for UV-lys. Det er således velkendt, at en stor fraktion af de organiske stoffer nedbrydes, når åvand strømmer ud i en fjord. Det gælder især farvede forbindelser (Stedmon et al. 2006; Markager et al. 2011). Der sker derfor en selektion, hvor de

stoffer, som absorberer lys, forsvinder, mens ikke-absorberende stoffer forbliver i vandet på vejen gennem vandløb og søer til fjorde og åbne marine områder (Massicotte et al. 2017). I udgangspunktet er UV-metoden derfor ikke egnet til vandprøver indsamlet i naturen og specielt ikke til marine prøver.

Det blev i foråret 2017 konstateret, at UV-metoden har været anvendt på vandprøver indsamlet under NOVANA-programmet siden 2010 for alle prøver og for en delmængde af prøver i perioden 2007-2009. Miljøstyrelsen har igangsat en kortlægning af hvilke metoder, som er anvendt for de enkelte prøver siden 2007.

I et notat fra Aarhus Universitet (Carstensen et al. 2018) blev det konkluderet, at UV-metoden i middel måler 13 % lavere end autoklavemetoden. Denne analyse var baseret på indsamlede prøver fra oktober 2017, som dækkede en stor del af overvågningsprogrammet for vandkemi. Analysen indikerede også, at der kunne være systematiske afvigelser mellem de to metoder, som afhæng af vandprøvens salinitet og prøvetagningsdybde. Endelig blev det vurderet, at afvigelsen mellem de to metoder kunne variere hen over året som følge af sæsonmæssige variationer i produktionen af 'frisk' organisk materiale og den naturlige UV-nedbrydning af farvede forbindelser. Da UV-metoden giver en mindre effektiv oxidering af ON, underestimerer målingerne ved denne metode mængden af TN. Der er derfor behov for at kvantificere, hvor stor afvigelsen mellem de to metoder er for forskellige tidspunkter på året, forskellige typer af vandmasser og prøvetagningsdybder.

For at vurdere forskellen mellem de to oxidationsmetoder ud fra et bredere datamateriale igangsatte Miljøstyrelsen et parallelprøvetagningsprogram for TN, som dækkede perioden 22. maj 2018 til 25. april 2019 fra et bredt udvalg af overvågningsstationer (se Bilag 1). Vandprøverne er sendt til Eurofins laboratoriet, hvor de efterfølgende er delt og analyseret med henholdsvis autoklave- og UV-metoden.

I dette notat er der foretaget en statistisk analyse af disse parallelprøver med henblik på at bestemme den systematiske forskel mellem de to metoder. Formålet er at opstille formler til korrektion af TN-målinger foretaget med UV-metoden. Kvantificering af usikkerheden ved anvendelse af disse formler indgår som et vigtigt element. Endelig vurderes betydningen af metodeafvigelsen for vurdering af miljøtilstanden.

Notatet er bestilt af Miljøstyrelsen den 16. maj 2018 med planlagt levering den 1. juli 2019. Bestillingen er vedlagt som bilag (Bilag 1). Tidfrist for aflevering blev efterfølgende forlænget til 31. oktober 2019 grundet forsinket dataleverance. Resultaterne har været præsenteret for Miljøstyrelsen på et møde i oktober 2019, og Miljøstyrelsen har haft mulighed for at kommentere udkast til notatet.

2 Datagrundlag og statistiske analyser

I dette afsnit beskrives datagrundlaget baseret på parallelprøvetagningen i perioden 22. maj 2018 til 25. april 2019. Alle indsamlede prøver fra dette parallelprøvetagningsprogram er sendt til Eurofins, hvor der er blevet kørt parallelanalyser med autoklave- og UV-oxidation. For at bestemme den organiske del (ON) er det nødvendigt at kende den uorganiske del (DIN). Koncentrationerne af ammonium og nitrat+nitrit er målt som en del af NOVANA-programmet, og disse data er trukket ud af den nationale database for overvågningsdata (ODA). I 2018 blev målingerne af de uorganiske næringssalte udført af Eurofins, men i 2019 overgik denne opgave til ALS laboratoriet. Da målingerne af TN i princippet foregår med samme laboratorieudstyr som målingerne af nitrat, så vil en bestemmelse af ON være mere præcis, når både TN og DIN er målt på samme laboratorium. Det er derfor muligt, at skiftet i NOVANA-programmet fra Eurofins til ALS kan medføre en større usikkerhed i analyserne baseret på 2019-data. Grundet denne potentielt større usikkerhed blev Eurofins bedt om også at måle uorganisk kvælstof på parallelprøverne i 2019, men desværre var det ikke muligt for to prøver i januar 2019, hvor der kun findes uorganisk kvælstofkoncentrationer målt af ALS.

2.1 Datagrundlag

Datagrundlaget udgør 778 vandprøver, som er indsamlet over et år på 46 stationer med en næsten ligelig fordeling mellem måneder bortset fra juli 2018, hvor der blev indsamlet lidt færre prøver. På størstedelen af stationerne er der indsamlet prøver hver måned, og på lidt over halvdelen af stationerne ($n = 29$) er der indsamlet prøver på flere dybder. Målingerne spændte bredt fra 120 til $8200 \mu\text{g l}^{-1}$ for TN målt med autoklave-oxidation og fra 82 til $8300 \mu\text{g l}^{-1}$ for TN målt med UV-oxidation.

Stationerne er opdelt i to grupper (1: fjorde og kystvande (33 stationer) og 2: åbne indre farvande (13 stationer)), da det organiske materiale i de åbne indre farvande har været udsat for UV-bestråling i længere tid end prøver taget tættere på ferskvandskilderne. Endvidere er vandprøverne opdelt efter overflade- (0-10 m) og bundvand (>10 m).

For et fåtal af prøver var forskellen mellem de to parallelprøver meget stor, og efter konsultation med Eurofins er disse målinger ikke medtaget i analysen. Det drejer sig om 8 vandprøver, hvoraf 1 og 7 målinger med henholdsvis autoklave- og UV-oxidation afveg kraftigt fra den normale TN-fordeling på den givne station. Derudover var der en prøve fra Korsør Nor, hvor TN-målingen med autoklave-oxidation var usædvanlig høj ($960 \mu\text{g l}^{-1}$), en del højere end det sædvanlige niveau ($300\text{-}500 \mu\text{g l}^{-1}$) og over tre gange højere end prøven målt med UV-oxidation. Selvom Eurofins har ensstemmende værdier ved dobbeltbestemmelse, så udelades denne observation fra analysen, da den afviger kraftigt fra det generelle mønster (outlier).

Da en eventuel effekt af oxidationsmetode kun påvirker den organiske fraktion i vandprøven, er koncentration af organisk kvælstof (ON) bestemt ved at trække den uorganiske fraktion (DIN) fra den målte TN-koncentration. DIN bestemmes som summen af målingerne af ammonium og nitrat+nitrit, men desværre var der 5 TN-observationer uden tilhørende DIN-målinger. Da der

er usikkerheder i bestemmelsen af DIN, foruden usikkerheden på TN, vil resultatet for ON være mere upræcist, når DIN udgør en stor del af TN-målingen. Derfor benyttes kun målinger af TN, hvor ON udgør mindst 25 % af TN, i den statistiske analyse. Dette kriterie resulterede i, at 76 observationer blev udeladt, og flere af disse observationer kunne karakteriseres som outliers. I den videre analyse benyttes derfor kun 688 observationer ud af de oprindelige 778 vandprøver, idet 9 observationer er udeladt som outliers, 5 observationer mangler DIN for at beregne ON, og 76 observationer er udeladt, fordi ON udgør mindre end 25 % af TN.

2.2 Statistisk analyse

Formålet med den statistiske analyse er: 1) at undersøge forskellen på TN målt med de to oxidationsmetoder for forskellige områder, sæsoner og dybder, og 2) at bestemme formler, som kan benyttes til at korrigere målinger af TN målt med UV-oxidation, så de svarer til det niveau, som en autoklave-oxidation ville have givet.

I Carstensen et al. (2018) blev det påvist, at variationen i TN-målinger afhang af måleniveauet, hvilket betyder, at der er større tilfældig variation på målinger af TN, når niveauet er højt. Det samme gør sig gældende for DIN og ON. Som konsekvens heraf antages koncentrationerne af næringsstoffer at være lognormal-fordelte. Da den potentielle forskel mellem de to oxidationsmetoder udelukkende relaterer sig til mængden af organisk kvælstof, er det kun ON-koncentrationerne, som analyseres i dette notat.

2.2.1 Sæsonmæssige og rumlige forskelle mellem oxidationsmetoder

Som en første analyse undersøges relationen mellem ON målt med autoklave- og UV-oxidation vha. regressionsmodellen fra Carstensen et al. (2018), hvor der er usikkerhed på begge variable. Denne relation er undersøgt separat for hver af de 12 måneder med data for at vurdere, om der kan være en sæsonmæssig forskel i oxidationseffektiviteten, og om der er forskel i variationen omkring disse regressionsmodeller (varianshomogenitet versus variansheterogenitet).

Resultaterne af denne analyse indikerede (se nedenfor), at forholdet mellem ON målt med de to metoder var relativt konstant for de enkelte måneder med en variation omkring regressionslinjerne, som ikke varierede væsentligt mellem måneder. På basis af disse resultater analyseres forholdet (R_{ON}) mellem ON målt med autoklave ($ON(AK)$) og UV-oxidation ($ON(UV)$) ($R_{ON} = ON(UV)/ON(AK)$) i det følgende for at undersøge, hvilke forhold som kan have betydning for forskellen i oxidationseffektivitet mellem de to metoder. Forholdet udtrykker effektiviteten af UV-oxidationen i forhold til autoklave. Da målingerne af ON antages lognormalfordelte, så vil forholdet mellem ON målt med de to oxidationsmetoder ligeledes være lognormalfordelt.

For at vurdere om der kunne være sæsonmæssige forskelle mellem oxidationsmetoder og om disse kunne variere mellem de to stationsgrupper (fjorde og kystvand hhv. åbne indre farvande) og mellem hhv. overflade og bundvand, blev følgende statistiske model anvendt for hver af de fire kombinationer

$$\ln(R_{ON}) = station_i + month_j + e_{ijk} \quad (2.1)$$

hvor $station_i$ beskriver den rumlige forskel mellem stationer, $month_j$ beskriver den sæsonmæssige variation, og e_{ijk} beskriver residualvariationen. Ud fra denne model blev middelværdierne for stationer og måneder bestemt, idet der blev taget højde for uens prøvetagning mellem stationer og mellem de enkelte måneder. For at undersøge hvilke faktorer, som er bestemmende for den rumlige variation, blev middelværdierne for station ($station_i$) analyseret i relation til middelværdier for salinitet (indikator for vandprøvens ophav mellem forskellige vandmasser) og klorofyl (indikator for mængden af partikulært organisk stof i vandprøven).

2.2.2 Relationer til genopretning af TN målt med UV-oxidation

Relationer, som kan benyttes til at omregne en TN-koncentration målt med UV-oxidation til en TN-koncentration målt efter forbehandling i autoklave, skal være baseret på information, som findes tilgængelig i overvågningsdatabasen. Dette betyder, at disse relationer ikke kan være baseret på målinger, som ikke findes mere eller mindre konsekvent i overvågningsdata, da det dermed ikke vil være muligt at rekonstruere størstedelen af TN-målingerne.

Følgende forklarende variable blev derfor undersøgt for at beskrive forskellen imellem de to oxidationsmetoder:

- Farvandstype ($stat_type$): Stationer er inddelt i 1) fjorde og kystvand og 2) åbne farvande.
- Vandtype ($water_type$): Vandprøver inddelt i 1) overfladeprøver (0-10 m) og 2) bundprøver (>10 m). Vandtype er underlagt farvandstype, så der kan være forskel på overflade- og bundvand for de to farvandstyper.
- Måned ($month$): Måned for prøvetagningen (12 niveauer).
- Salinitet ($sali$): Den målte salinitet fra samme prøve.
- Klorofyl a (chl_a): Den målte koncentration af klorofyl a fra samme prøve.

Følgende to modeller blev undersøgt ud fra de mulige forklarende variable, idet salinitet og klorofyl ikke blev brugt samtidig for at undgå en overparameteriseret model. For salinitet som forklarende variabel:

$$\ln(R_{ON}) = sali + month_i + sali \times month_i + stat_type_j + sali \times stat_type_j + month_i \times stat_type_j + water_type_k(stat_type_j) + sali \times water_{type_k}(stat_{type_j}) + month_i \times water_{type_k}(stat_{type_j}) + e_{ijk} \quad (2.2)$$

og for klorofyl som forklarende variabel (ln-transformeret):

$$\ln(R_{ON}) = lnchl_a + month_i + logchl_a \times month_i + stat_type_j + logchl_a \times stat_type_j + month_i \times stat_type_j + water_type_k(stat_type_j) + logchl_a \times water_{type_k}(stat_{type_j}) + month_i \times water_{type_k}(stat_{type_j}) + e_{ijk} \quad (2.3)$$

Udover de ovenfor beskrevne forklarende variable/effekter ($stat_type$, $water_type$, $month$, $sali/lnchl_a$) indgår der fem interaktioner med følgende fortolkning: 1) $sali \times month_i$ eller $logchl_a \times month_i$ beskriver en månedsspecifik relation til $sali$ eller $logchl_a$, 2) $sali \times stat_type_j$ eller $logchl_a \times stat_type_j$ beskriver en farvandsspecifik relation til $sali$ eller $logchl_a$, 3) $month_i \times stat_type_j$ beskriver en farvandsspecifik månedsvariation, 4) $sali \times water_{type_k}(stat_{type_j})$ eller $lnchl_a \times water_{type_k}(stat_{type_j})$ beskriver en vandtypespecifik relation til $sali$ eller $logchl_a$ og 5) $month_i \times water_{type_k}(stat_{type_j})$ beskriver sæsonvariationer, som er specifikke for kombinationer af farvandstyper og vandtyper.

For hver af disse modeller blev ikke-signifikante komponenter fjernet en ad gangen (mindst signifikante), indtil alle resterende komponenter var signifikante ($P < 0,05$). De resulterende modeller fra denne iterative modelidentifikation vil blive præsenteret i næste afsnit.

3 Resultater og diskussion

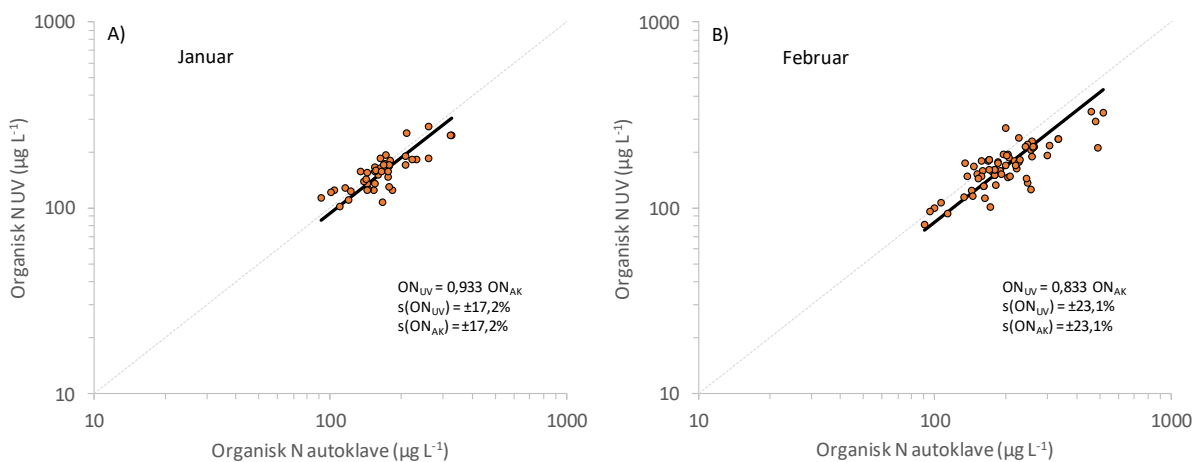
TN i de analyserede vandprøver ($n = 688$) varierede med en faktor ca. 20 (tabel 3.1), og $TN(UV)$ var i middel 86 % af $TN(AK)$, hvorimod forskellen mellem middelværdier for $ON(UV)$ og $ON(AK)$ var lidt større som forventet ($ON(UV)$ udgjorde i middel 81 % af $ON(AK)$). Middelværdier for forholdet mellem $ON(UV)$ og $ON(AK)$ var dog lidt højere, da fordelingen af R_{TN} er højre-skævt. Der var stor forskel mellem $ON(UV)$ og $ON(AK)$ for enkeltmålinger, idet målinger af $ON(AK)$ kunne være mere end dobbelt så høje som $ON(UV)$, og tilsvarende kunne målinger af $ON(UV)$ være op til 67 % højere end $ON(AK)$.

Tabel 3.1. Fordeling af TN-målinger og beregnede ON-målinger (TN-DIN).

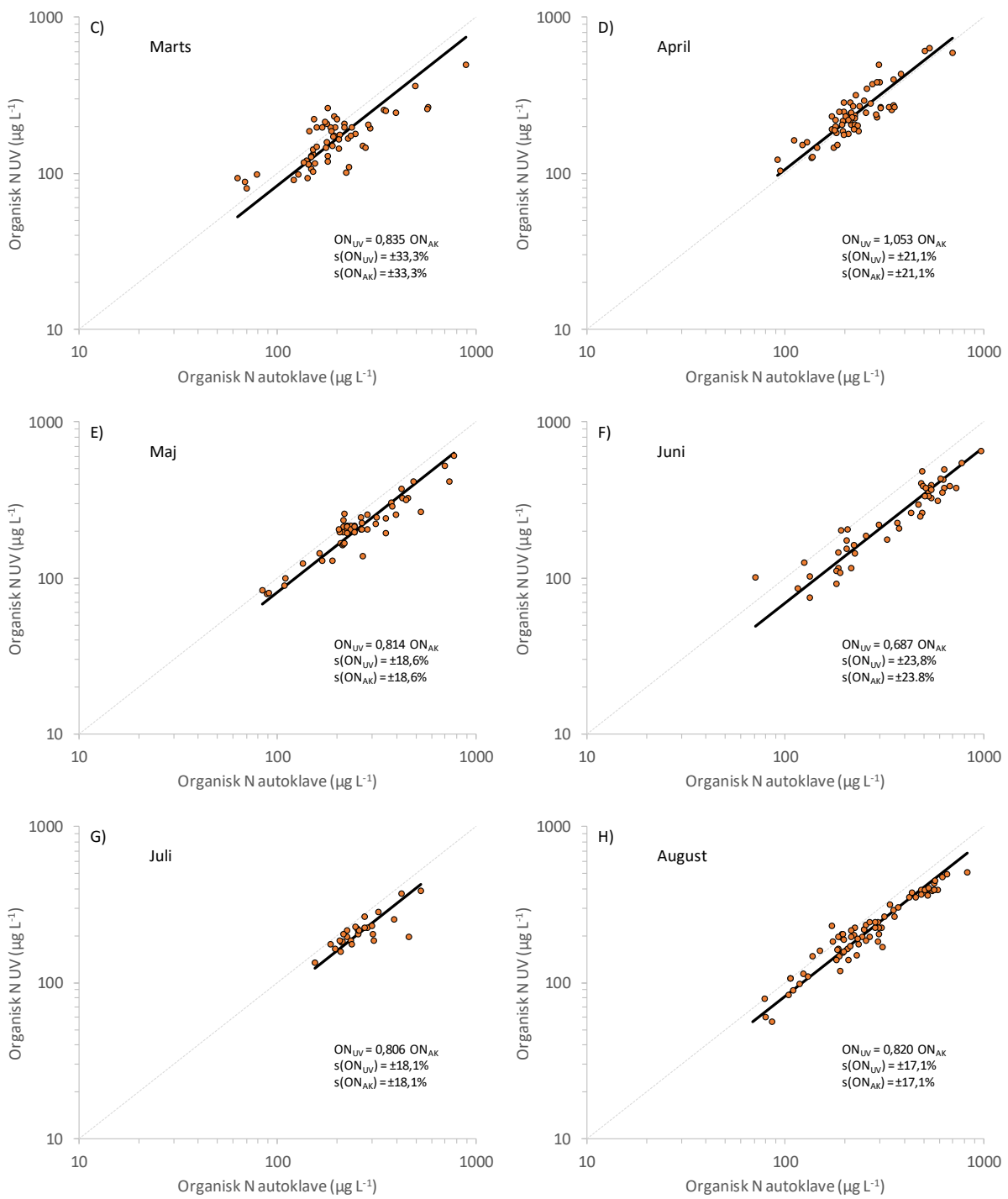
Variabel	Min.	Maks.	Middel	Spredning
$TN(AK)$	120	2400	358	255
$TN(UV)$	82	2100	308	219
$ON(AK)$	47	2029	264	164
$ON(UV)$	42	1729	215	116
R_{ON}	0,43	1,67	0,86	0,19

3.1 Sæsonmæssige variationer

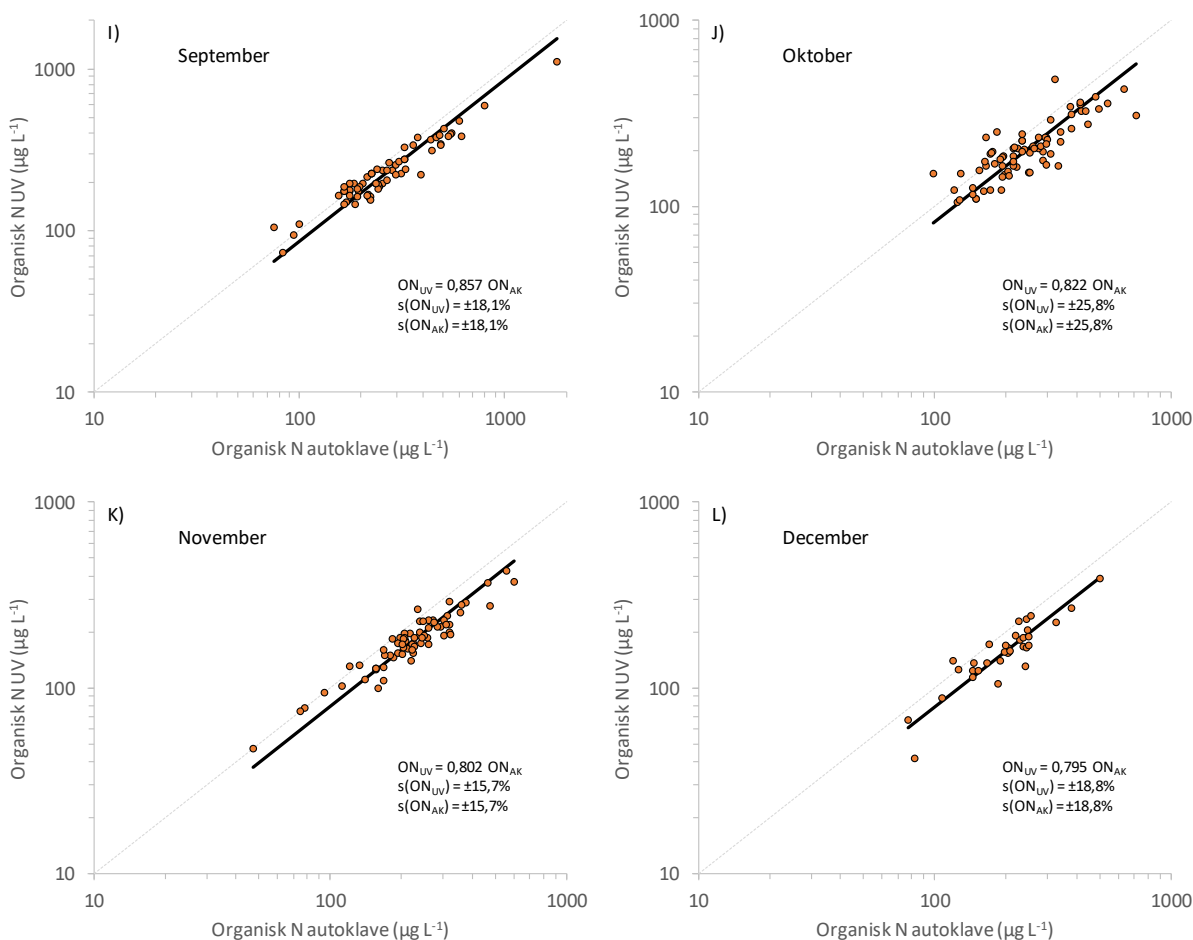
Der var en rimelig overensstemmelse mellem de to oxidationsmetoder vurderet ud fra ON-observationerne (figur 3.1), hvilket i stor udstrækning skyldes den store variationsbredde i målingerne. For 10 af månederne varierede forholdet mellem de to oxidationsmetoder mellem 0,79 og 0,93, svarende til at UV-oxidationen er 10-20 % mindre effektiv end autoklave. Derimod var målingerne med UV-oxidation højere end autoklave i april (forhold = 1,05) og meget lavere i juni (forhold = 0,69). De relativt højere værdier for R_{ON} i april skyldes 49 prøvetagninger i ugen før påske (8-12/4), hvor $ON(UV)$ i middel var 10 % højere end $ON(AK)$. Til sammenligning var $ON(UV)$ 3 % lavere end $ON(AK)$ for de resterende 15 prøver i april. Den relative afvigelse mellem de to oxidationsmetoder rangerede mellem 16 % og 33 %, størst i marts og mindst i november. De lineære relationer og forholdsvis ensartede afvigelser for observeret ON i forhold til regressionslinjerne medfører, at det er fornuftigt at betragte R_{ON} som regressionsvariabel i de efterfølgende analyser.



Figur 3.1 fortsætter på næste side.

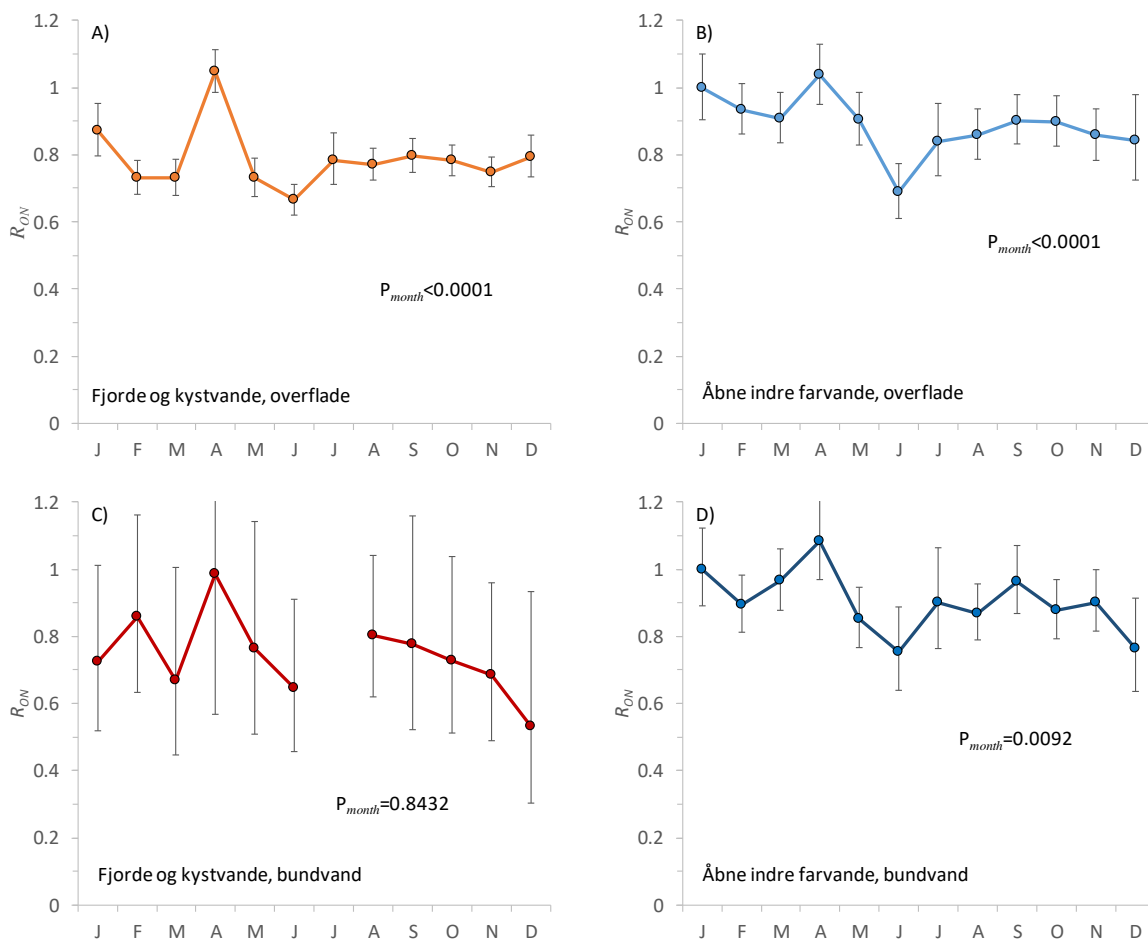


Figur 3.1 fortsætter på næste side.



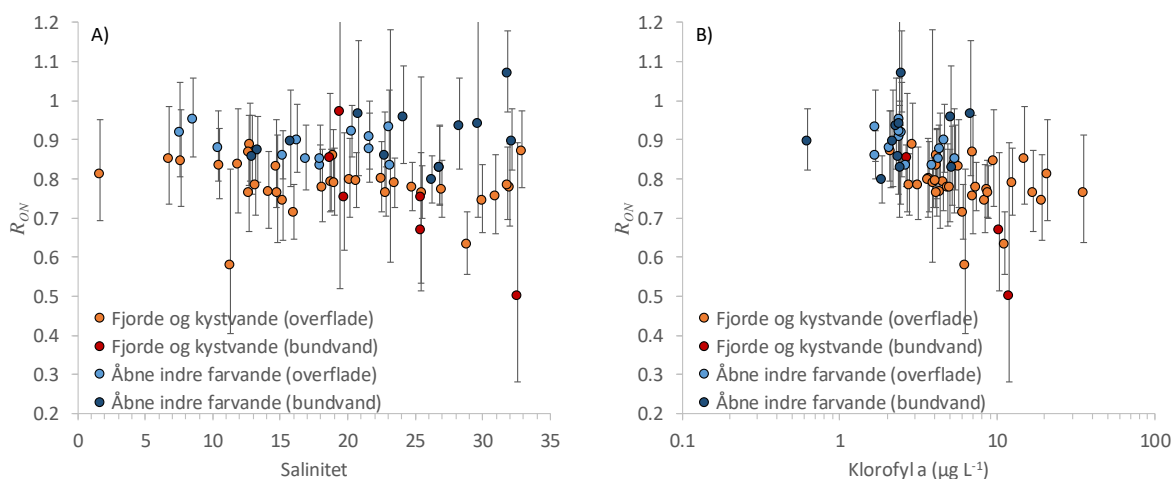
Figur 3.1. Relationer for ON-koncentrationer bestemt med henholdsvis autoklave- og UV-oxidation. Relationen er estimeret ved regression med usikkerhed på begge målinger. De estimerede relationer og den relative spredning omkring relationen for begge variable er angivet i graferne.

Forholdet mellem ON målt med de to forskellige oxidationsmetoder varierede signifikant mellem måneder (*figur 3.2*), med undtagelse af bundvand i fjorde og kystvande, hvor der kun var 30 observationer i alt (*figur 3.2C*). Hvis der ses bort fra april, udviste R_{ON} i overfladen for fjorde og kystvande et sæsonmønster med lidt lavere værdier fra februar til juni og lidt højere værdier fra juli til december (*figur 3.2A*). I overfladen for de åbne indre farvande var sæsonmønstret næsten omvendt med de højeste værdier for R_{ON} i årets første seks måneder og lavere værdier i andet halvår (*figur 3.2B*). Forholdet for overfladeprøver var generelt lavere for fjorde og kystvande, hvilket indikerer, at UV-oxidation er mindre effektive på disse prøver, som generelt indeholder større mængder af organisk materiale (Asmala et al. 2018). Sæsonvariationen i bundvandet for de åbne indre farvande var meget lig den for overfladevandet (*figur 3.2D*), hvilket indikerer, at lysintensiteten i vandet har en mindre betydning på den relative effektivitet af UV-oxidationen.



Figur 3.2. Sæsonvariation i forholdet for ON målt med UV og autoklave (R_{ON}) for overflade- og bundvand i henholdsvis fjorde og kystvande samt åbne indre farvande. Variationerne er bestemt som middelværdier fra en statistisk model, som beskriver forskellen mellem stationer og måneder (fig. 2.1). Error bars angiver 95 % konfidensinterval for månedsmidlerne. Signifikansen af variationen mellem måneder er angivet i de enkelte plots.

Variationen mellem stationer var derimod kun signifikant for bundvandsprøver fra de åbne indre farvande ($P_{station} = 0,0059$), men denne forskel var hovedsageligt drevet af høje værdier på en enkelt station (VSJ20925). Der var ingen umiddelbar geografisk systematik i stationsmiddelværdierne for R_{ON} . Ligeledes var stationsmidler ikke korrelerede med salinitet for nogen af de fire forskellige typer af havvand (figur 3.3A). Der var dermed ingen indikation af, at opblandingen mellem Østersøvand og Nordsøvand har betydning for effektiviteten af UV-oxidationen. Dette på trods af at Østersøvand har et større indhold af organisk materiale, som antages at være mindre nedbrydeligt grundet den lange opholdstid i Østersøen (Stedmon et al. 2007; Hoikkala et al. 2015). For stationerne i fjorde og kystvande var der heller ingen indikation af, at effektiviteten af UV-oxidationen skulle være afhængig af salinitet. Derimod var stationsmidlerne bedre korreleret med klorofylniveauet for stationen (figur 3.3B), hvilket indikerer, at effektiviteten af UV-oxidationen falder med stigende mængde af partikulært organisk materiale.



Figur 3.3. Relationer mellem stationsmidler for R_{ON} og salinitet (A) og klorofyl a (B). Stationsmidler er bestemt fra en statistisk model, som beskriver forskellen mellem stationer og måneder (lig. 2.1). Error bars angiver 95 % konfidensinterval for stationsmidlerne.

3.2 Empiriske relationer til korrektion af UV-målinger

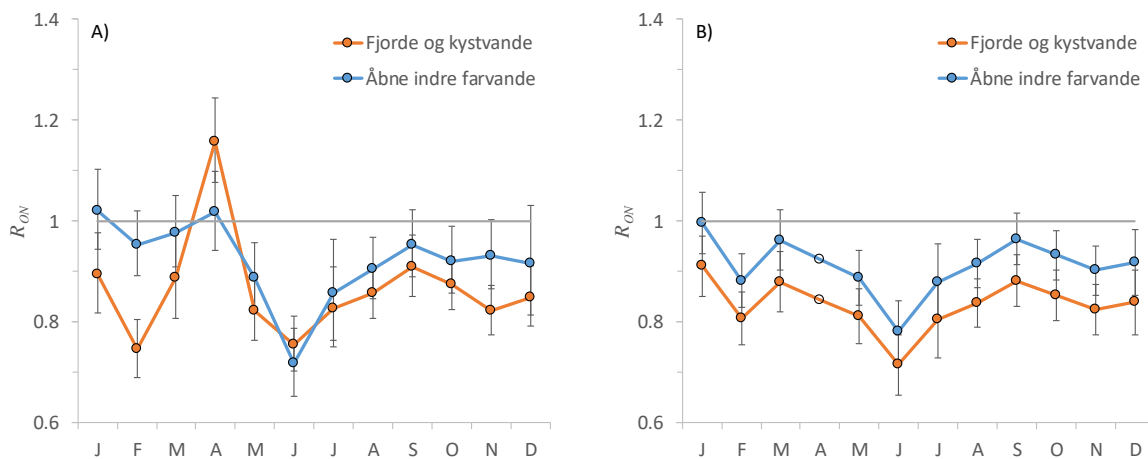
Analyse af modellen med salinitet som forklarende variable i kombination med farvandstype, vandtype og måned (lig. 2.2) viste, at R_{ON} ikke kunne beskrives ved hjælp af salinitet (tabel 3.2). Modellen viste kun sæsonmæssige og rumlige variationer i R_{ON} , og modellen forklarede 29 % af variationen i $\ln(R_{ON})$. Modellen med klorofyl a var væsentlig bedre og kunne forklare 37 % af variationen i $\ln(R_{ON})$ på basis af fire signifikante effekter: klorofyl a ($\log chla$), sæsonvariation ($month_i$), farvandstype ($stat_type_j$) og farvandsspecifik sæsonvariation ($month_i \times stat_type_j$). Modellen med klorofyl a blev estimeret på færre observationer, da der ikke var tilhørende klorofylobservationer for alle parallelprøvetagninger. Residualspredningen i denne model svarer til en relativ spredning på 18,3 %, hvilket er på niveau med de laveste relative spredninger for relationerne mellem de to oxidationsmetoder (figur 3.1).

Tabel 3.2. Test af effekter i lig. 2.2 og 2.3 angivet ved P-værdien (x er enten *sali* eller *lnchla*). NS angiver, at effekten ikke var signifikant og derfor fjernet fra modellen. Endvidere er angivet antal observationer, forklaringsgraden R^2 og residualspredningen.

Effekter	Salinitet	Klorofyl a
x	NS	<0,0001
$month_i$	<0,0001	<0,0001
$stat_type_j$	<0,0001	0,0002
$x \times stat_type_j$	NS	NS
$month_i \times stat_type_j$	NS	0.0007
$water_type_k(stat_type_j)$	NS	NS
$x \times water_type_k(stat_type_j)$	NS	NS
$month_i \times water_type_k(stat_type_j)$	NS	NS
Antal observationer	688	523
R^2	0,2884	0,3682
Spredning residualer	0,1852 ($\pm 20,3$ %)	0,1677 ($\pm 18,3$ %)

Sammenligningen af de to modeller tyder umiddelbart på, at forskellen mellem de to oxidationsmetoder afhænger mere af mængden af fytoplankton (og dermed også mængden af partikulært materiale) end af salinitet som indikator for vandmassens ophav. Dette stemmer overens med analysen for stationsmidlerne (figur 3.3). Dette kan skyldes, at fytoplanktonceller har en naturlig beskyttelse mod UV-stråling, idet cellevæggen indeholder UV-absorbierende stoffer (Sinha et al. 1998). Endvidere kan det tænkes, at UV-lyset har sværere ved at nedbryde fytoplanktonceller og andre større partikler, idet intensiteten af UV-lyset vil aftage, efterhånden som det trænger længere ind i cellen/partiklen. Effektiviteten af UV-oxidationen var mindre for fjorde og kystvande end åbne indre farvande (ca. 8,6 %). Denne større afvigelse mellem autoklave og UV-oxidation for fjorde og kystvande skyldes formentlig, at vandprøver fra fjorde og kystvande indeholder en større mængde partikler udover fytoplanktonceller (medtaget i modellen via klorofyl a), som nedsætter effektiviteten af UV-oxidationen. Endvidere er de organiske molekyler i ferskvand større end i det marine (Asmala et al. 2018), hvilket også kan påvirke nedbrydeligheden af ON med lys/UV.

Sæsonvariationen fulgte, med undtagelse af april, et mønster med størst forskel mellem oxidationsmetoder om sommeren og mindst om vinteren (figur 3.4A). Selvom den farvandsspecifikke sæsonvariation var signifikant ($month_i \times stat_type_j$ i tabel 3.2), så var signifikansen af denne effekt drevet af målinger fra april, hvor en del af parallelprøverne afveg kraftigt fra det forventede mønster (figur 3.1D). Såfremt målingerne fra april ikke blev medtaget i modellen, så var den farvandsspecifikke sæsonvariation kun marginalt signifikant ($P = 0,0382$). Derfor blev modellen reduceret til at have en fælles sæsonvariation ($month_i$) men med en farvandsspecifik forskel ($stat_type_j$), udover relationen til klorofyl a ($lnchla$). Effektiviteten af UV-oxidationen i forhold til autoklave, resulterede i en mere jævn sæsonvariation (figur 3.4B), hvor R_{ON} varierede fra 0,91 i januar til 0,71 i juni for fjorde og kystvande, og tilsvarende fra 1,00 i januar til 0,78 i juni for de åbne indre farvande. Da den reducerede model blev bestemt uden målinger fra april, så er sæsonmidlerne for april bestemt ved interpolation af parameterestimaterne for marts og maj.



Figur 3.4. Sæsonvariation i forholdet for ON målt med UV og autoklave (R_{ON}) for fjorde og kystvande samt åbne indre farvande for modellen med klorofyl a som forklarende variabel (lig. 2.3). Sæsonmidlerne er udregnet for en koncentration af klorofyl på $1 \mu\text{g l}^{-1}$. Modellen er estimeret med (A) og uden (B) farvandsspecifik sæsonvariation (middelværdi for april er interpoleret). Error bars angiver 95 % konfidensinterval for månedsmidlerne.

Den større forskel mellem de to oxidationsmetoder i sommermånederne kan skyldes en 1) større naturlig UV-påvirkning og 2) sæsonvariation i klorofyl *a* i forhold til fytoplanktonbiomasse. Ad 1), havvand om sommeren har typisk været udsat for kraftig naturlig UV-bestråling, hvorved det letnedbrydelige ON allerede er omsat. Dermed øges den relative andel af refraktionært ON, hvilket kan medføre en mindre effektiv oxidation med UV under analysen. Der var imidlertid ingen forskel i sæsonvariationen mellem overflade og bundvand (figur 3.2), ligesom der ikke var nogen konsistent relation med dybden for prøverne taget om sommeren. Derfor vurderes det, at effekten af den naturlige UV-bestråling er minimal. Ad 2), klorofyl benyttes som et mål for mængden af fytoplankton i vandprøven, men der er en stor sæsonmæssig variation i forholdet mellem fytoplanktonbiomasse og klorofyl (Jakobsen & Markager 2016). Dette betyder, at mængden af fytoplankton i forhold til klorofyl *a* er højere om sommeren. Dermed undervurderes effekten af fytoplanktonceller (og formentlig også andet partikulært kvælstof, eksempelvis detritus, som er tæt koblet til fytoplanktonbiomasse), når *logchla* benyttes som forklarende variabel. Den sæsonmæssige variation i forholdet mellem fytoplanktonbiomasse og klorofyl *a* kompenseres derfor af sæsonvariationen $month_i$ i modellen.

Modellen for korrektion af målinger med UV-oxidation er således:

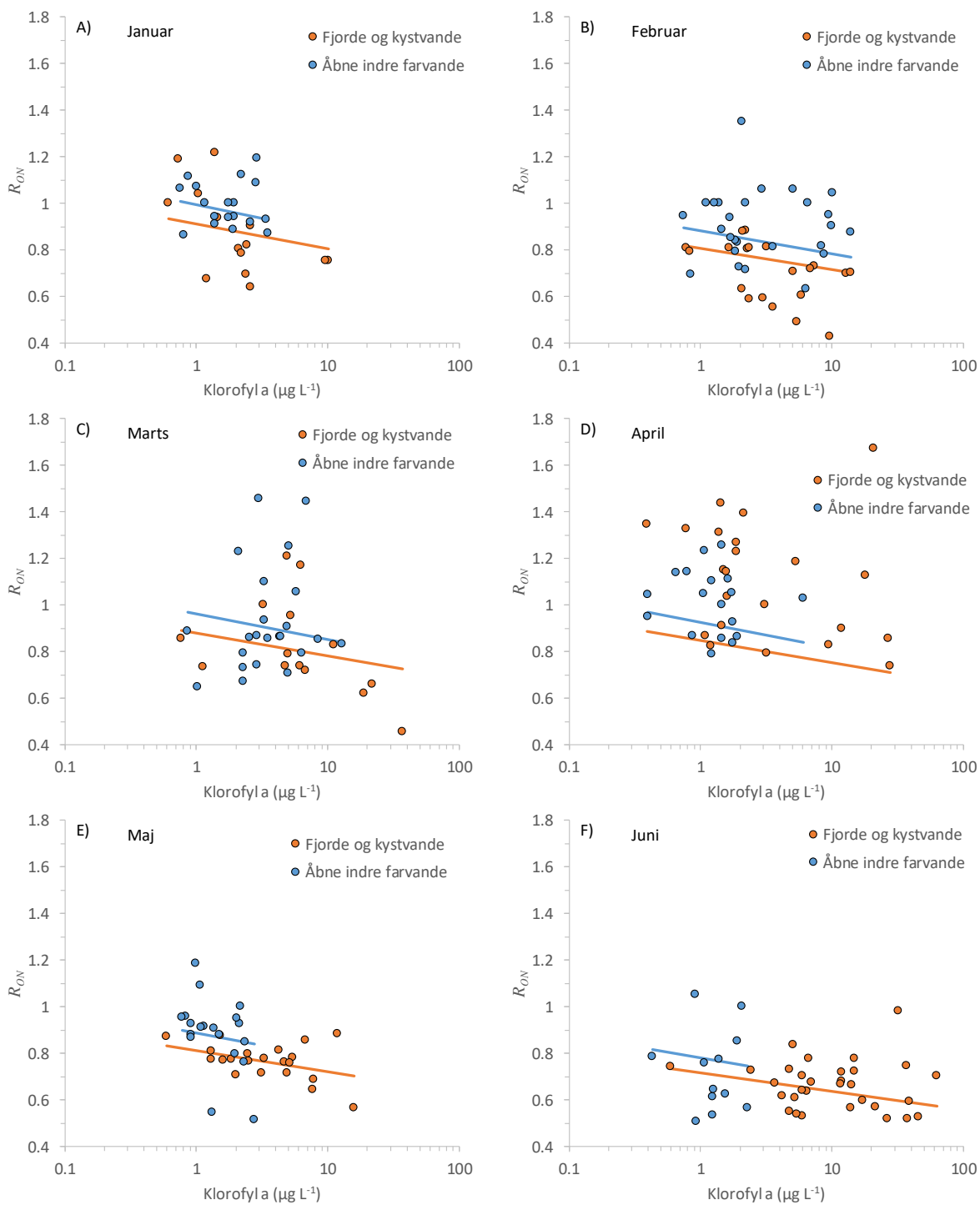
$$\ln(R_{ON}) = a \cdot \ln(chla) + month_i + stat_type_j + e_{ijk} \quad (3.1)$$

med parameterestimer angivet i tabel 3.3 og en residualvariation på 0,167790 ($\pm 18,3\%$).

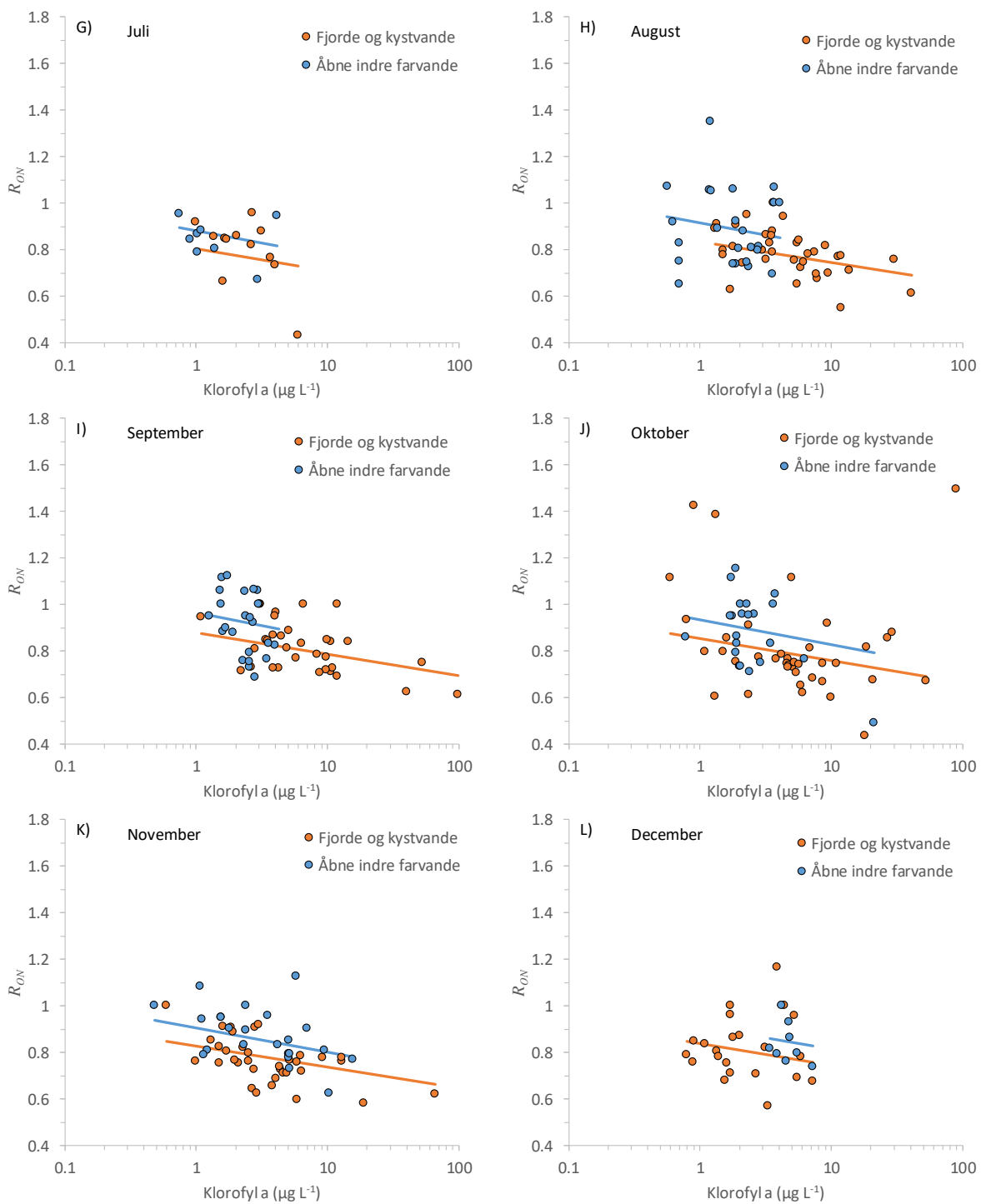
Tabel 3.3. Parameterestimer og deres usikkerhed for model til korrektion af TN målt med UV-oxidation. Parameterestimatet for april er bestemt som gennemsnit af parameterestimerne for marts og maj.

Parameter	Niveau	Estimat	Spredning
<i>a</i>	-	-0,0523	0,0091
$month_i$	Januar	-0,0043	0,0306
	Februar	-0,1264	0,0269
	Marts	-0,0392	0,0303
	April	-0,0796	-
	Maj	-0,1200	0,0281
	Juni	-0,2473	0,0303
	Juli	-0,1291	0,0388
	August	-0,0886	0,0246
	September	-0,0367	0,0262
	Oktober	-0,0705	0,0253
	November	-0,1039	0,0252
	December	-0,0869	0,0331
$stat_type_j$	Fjorde og kystvande	-0,0897	0,0169
	Åbne indre farvande	0,0000	0,0091

På trods af stor variation i R_{ON} udviste alle måneder en generelt faldende tendens med stigende klorofyl (figur 3.5). Det bemærkes også, at R_{ON} generelt er højere for parallelprøver taget i de åbne indre farvande, end hvis prøverne var taget i fjorde og kystvande. En undtagelse er dog april, hvor de fleste observationer afveg fra det normale og forventede mønster (figur 3.1D).



Figur 3.5 fortsætter på næste side.



Figur 3.5. Observationer og relationer for R_{ON} mod klorofyl a for fjorde og kystvande samt åbne indre farvande. Relationerne er bestemt ud fra *fig. 3.1* med parameterestimer (*tabel 3.3*).

3.3 Metode for korrektion af TN-målinger med UV-oxidation

Proceduren for at korrigere TN-målinger målt med UV-oxidation i databasen er derfor:

1. Bestem koncentrationen af organisk N ($ON(UV)$) ved at trække den uorganiske fraktion ($DIN =$ summen af de uorganiske næringsalte) fra den målte koncentration af TN målt med UV-oxidation ($TN(UV)$). Eksempelvis er $TN(UV) = 180 \mu\text{g l}^{-1}$ og $DIN = 4 \mu\text{g l}^{-1}$ for station FYN6300043 på datoen 14-03-2016 og dybden 1 m. $ON(UV)$ bliver derfor $176 \mu\text{g l}^{-1}$.
2. Bestem korrektionsfaktoren $\ln(R_{ON})$ ud fra *lig. 3.1* og parameterestimater i *tabel 3.3*. Derefter transformeres tilbage, dvs. $R_{ON} = \exp(\ln(R_{ON}))$. Hvis R_{ON} er større end 1, sættes R_{ON} til 1, hvilket medfører, at korrektionen ikke kan resultere i en lavere værdi for TN. Dette vil kun være relevant for meget lave klorofyl a-værdier ($< 0,5 \mu\text{g l}^{-1}$), hvilket er tæt på detektionsgrænsen.

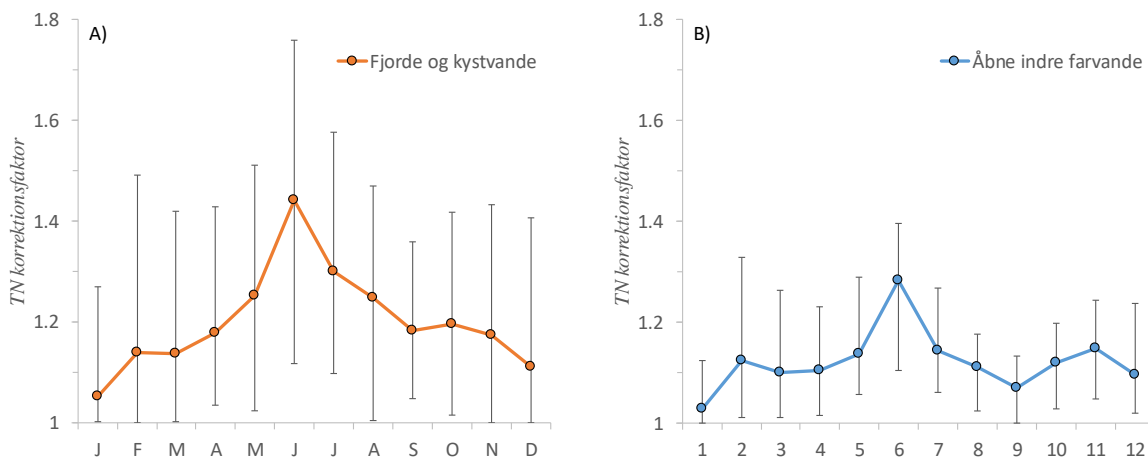
For eksemplet FYN6300043 er klorofyl a-koncentrationen $2,08 \mu\text{g l}^{-1}$, og da stationen ligger i den åbne del af det sydlige Lillebælt fås

$$\ln(R_{ON}) = -0,0523 \cdot \ln(2,08) - 0,0392 + 0,000 = -0,0774$$

hvilket giver en korrektionsfaktor på 0,9255. Organisk N ville derfor, såfremt det var bestemt efter autoklave-oxidation, være $190,2 \mu\text{g l}^{-1}$, og dermed ville TN være $194,2 \mu\text{g l}^{-1}$. Dette svarer til en opjustering af TN med 7,9 %.

Hvis der ikke er en tilhørende måling af klorofyl a, så benyttes en middelværdi for klorofyl a for den pågældende station, måned og dybde.

For at vurdere størrelsen på korrektionen for TN er ovenstående procedure udført for de stationer, som indgår i den årlige rapportering omkring tilstanden i de marine områder (Hansen (red.) 2019). For fjorde og kystvande varierer korrektionen af TN i middel fra 5,2 % i januar til 44,2 % i juni, men korrektionen kunne være op til 75,9 % (*figur 3.6A*). Korrektionen for åbne indre farvande var mindre, i middel fra 2,8 % i januar til 28,3 % i juni, med en største TN-korrektion på 39,5 % (*figur 3.6B*). Vurderet over data fra hele året, så var gennemsnitskorrektionen 21,2 % for fjorde og kystvande og 12,4 % for åbne indre farvande.



Figur 3.6. Fordeling af forholdet mellem TN korrigeret og målt med UV-oxidation over årets måneder. Error bars angiver min. og maks. for justeringsfaktoren.

Gennemsnitskorrektionen tager dog ikke højde for fordelingen af prøver over året og vil derfor være højere, hvis der tages flere prøver om sommeren end om vinteren. Til sammenligning underestimerede UV-oxidation TN-koncentrationen med 13 % for et mindre datasæt med parallelmålinger af prøvetagninger foretaget i oktober 2017 (Carstensen et al. 2018), hvilket svarer til en korrektionsfaktor på 15 %. Resultaterne i nærværende notat stemmer derfor overens med resultaterne i Carstensen et al. (2018).

Korrektionsmetoden antager, at den etablerede relation baseret på data fra maj 2018 til april 2019 kan anvendes mere generelt. Denne antagelse vurderes at være rimelig, da nedbrydeligheden af det organisk kvælstof i alger, i tilførslerne fra land, og i vandmasserne fra Østersøen og Nordsøen ikke forventes at have ændret sig væsentligt fra år til år i perioden 2008-2017, ud over en markant sæsonvariation.

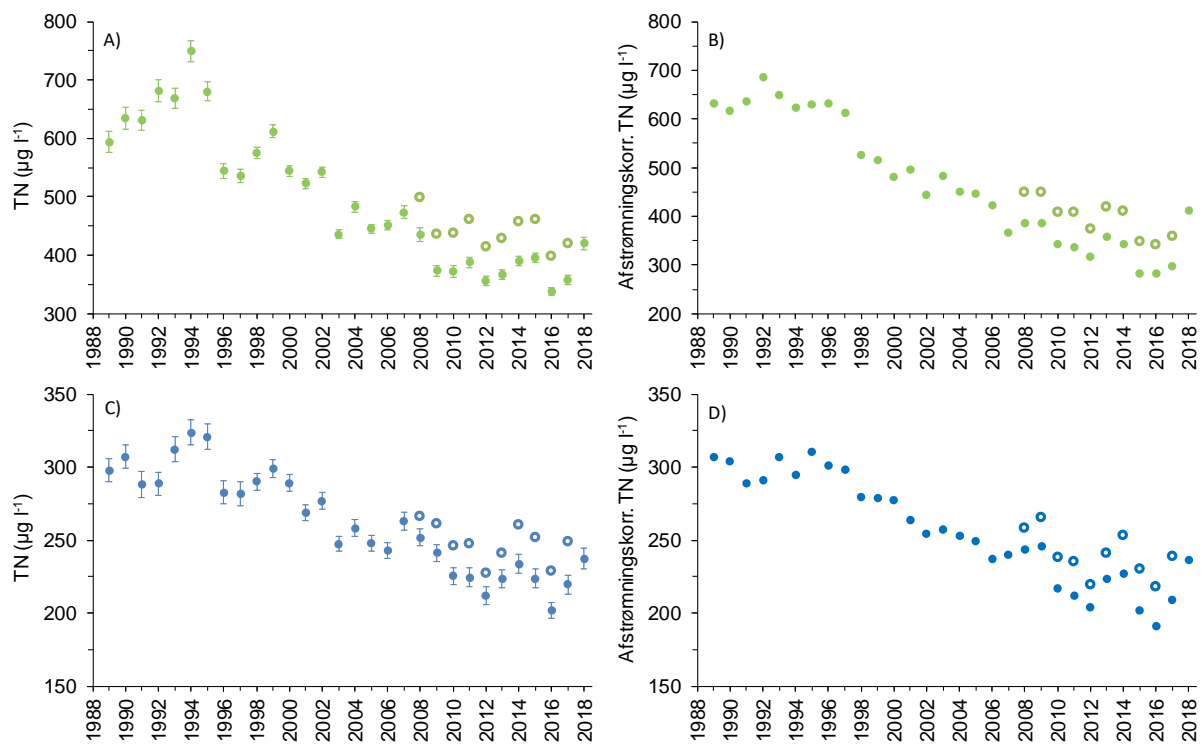
Det skal bemærkes, at datasættet med parallelprøvetagninger ikke indeholder prøvetagninger fra den åbne del af Nordsøen eller Skagerrak. Der er målt TN på stationer i disse områder fra 2014 til 2017, men disse analyser er udført af Analytech med autoklave-oxidation. Derfor vil der ikke være behov for at korrigere disse målinger.

3.4 Konsekvenser for trendanalyser

For at vurdere implikationen af at korrigere TN-målinger med UV-oxidation er udviklingen i årsmidler for fjorde og kystvande samt åbne indre farvande udregnet med korrigerede værdier og sammenstillet med ukorrigerede værdier (*figur 3.7*). Alle observationer fra 2008 og 2009 er korrigeret, selvom det ikke er sikkert, at alle TN-målinger er foretaget med UV-oxidation. Derfor kan de korrigerede årsmidler for disse to år være for høje.

Efter korrektion af TN-målinger blev årsmidlerne fra 2008 til 2017 15-19 % højere for fjorde og kystvande og 6-13 % højere for overfladevandet i de åbne indre farvande. Disse resultater stemmer umiddelbart overens med de 13 %, som blev bestemt i Carstensen et al. (2018) og dækkede over både fjorde, kystvande og åbne indre farvande. Sammenlignet med gennemsnitskorrektionsfaktorerne i forrige afsnit (21,2 % for fjorde og kystvande og 12,4 % for åbne indre farvande), så er effekten af korrektionen mindre for årsmidler, som vægter alle observationer i forhold til station og måned. Da der er flere målinger i inderfjorde med højere klorofylniveauer, vil gennemsnittet af korrektionen derfor være højere end den vægtede middelværdi fra den årlige rapportering.

Samlet set, så betyder det, at korrektionen har større betydning for trendanalyser for inderfjorde end trendanalyser for yderfjorde, kyster og åbne farvande. Korrektionen af TN vil være mindst for bundvandet i de åbne indre farvande, hvor en stor del af TN udgøres af uorganiske næringssalte.



Figur 3.7. Udviklingen over tid for TN i fjorde og kystvande (A-B) og åbne indre farvande (0-10 m) (C-D). Tidstrends beregnet med korrigerede værdier for TN er vist med åbne symboler.

4 Sammenfattende konklusioner og anbefaling

Miljøstyrelsen har i 2018 og 2019 indsamlet 778 vandprøver fra et bredt udvalg af overvågningsstationer. Disse prøver er efterfølgende sendt til analyse for koncentrationen af total kvælstof (TN) hos Eurofins for kvantitativt at bestemme forskellen mellem UV og autoklave som oxidationsmetode i forbindelse med målingerne. Derfor er alle prøver opdelt og kørt parallelt med de to oxidationsmetoder for at etablere et datagrundlag, hvormed formler til korrektion af TN i marine prøver kan bestemmes. Data fra dette parallelprøvningsprogram er sammenstillet med tilhørende overvågningsdata, således at koncentrationen af de uorganiske næringssalte, salinitet og klorofyl også kendes for størstedelen af prøverne.

De to oxidationsmetoder har forskellig effektivitet med hensyn til at nedbryde og oxidere organisk kvælstof (ON), og derfor må en sammenligning af de to metoder baseres alene på ON. Analysen af de indsamlede data viste, at forskellen mellem de to metoder afhænger af 1) tidspunktet på året (måned) for indsamlingen af prøven, 2) om prøven er indsamlet fra fjorde og kystvande eller de åbne indre farvande, og 3) mængden af klorofyl a i prøven. Det vurderes, at UV-oxidationen i forhold til autoklave bliver mindre effektiv, når der er flere fytoplanktonceller og andet partikulært organisk materiale i prøven.

Opblandingsforholdet mellem Østersøvand og Nordsøvand i de indre danske farvande har ikke nogen umiddelbar signifikant effekt på forskellen mellem de to oxidationsmetoder. Ligeledes var der heller ikke variationer i forholdet mellem de to oxidationsmetoder, som indikerede en effekt af vandprøvens eksponering til UV inden prøvetagning.

Der er bestemt en relation ud fra de statistiske analyser, som kan benyttes til at korrigere målinger af TN med UV-oxidation, som baserer sig på måneden for prøvetagningen, stationen for prøvetagningen (fjorde og kystvande eller åbne indre farvande) og mængden af klorofyl a i prøven. Modellen kan bestemme forholdet mellem ON fra de to oxidationsmetoder med en usikkerhed på $\pm 18,3$ %, hvilket er på niveau med den accepterede måleusikkerhed (20 %).

Metoden for korrektion af TN målt med UV-oxidation er beskrevet. Korrektionen er størst for prøver fra fjorde og kystvande, hvor den kan variere fra 5 % i januar til 44 % i juni. For de åbne indre farvande kan korrektionen variere fra 3 % i januar til 28 % i juni. Som konsekvens af denne korrektionsmetode vil årsmidler (2008-2017) for TN, i forbindelse med den årlige rapportering om havmiljøets tilstand, blive opjusteret med 15-19 % for fjorde og kystvande og 6-13 % for overfladevandet i de åbne indre farvande. Korrektionen for bundvandet i de åbne indre farvande vil være mindre, da en større del af TN udgøres af uorganiske næringssalte.

Det anbefales, at de foreslåede formler til korrektion af TN målt med UV-oxidation implementeres i den nationale database for overvågningsdata.

5 Referencer

Asmala E, Haraguchi L, Markager S, Massicotte P, Riemann B, Staehr PA & Carstensen J (2018) Eutrophication leads to accumulation of recalcitrant autochthonous organic matter in coastal environment. *Global Biogeochemical Cycles* 32: 1673-1687. <https://doi.org/10.1029/2017GB005848>

Carstensen J, Larsen MM, Christensen JP & Timmermann K (2018) Betydningen af oxidationsmetode for målinger af total kvælstof og total fosfor i marine prøver. Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi. http://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notater_2018/Maalinger_TN_og_TP_i_marine_proever.pdf

Eurofins (2014) Total nitrogen i vand. NOTAT fra Naturstyrelsens Reference-laboratorium for Kemiske og Mikrobiologiske Miljømålinger. http://www.reference-lab.dk/media/10350236/notat_tn_i_vand_2014.pdf

Hansen, J.W. (red.) (2019): Marine områder 2017. NOVANA. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 128 s. - Videnskabelig rapport nr. 308. <https://dce2.au.dk/pub/SR308.pdf>

Hoikkala L, Kortelainen P, Soinne H & Kuosa H (2015) Dissolved organic matter in the Baltic Sea. *Journal of Marine Systems* 142: 47-61. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2014.10.005>

Jakobsen HH & Markager S (2016) Carbon-to-chlorophyll ratio for phytoplankton in temperate coastal waters: Seasonal patterns and relationships to nutrients. *Limnology & Oceanography* 61: 1853-1868. <https://doi.org/10.1002/lno.10338>

Markager S, Stedmon C & Søndergaard M (2011) Seasonal dynamics and conservative mixing of dissolved organic matter (DOM) in the temperate eutrophic estuary Horsens Fjord. *Estuarine and Coastal Shelf Science* 92:376-388. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.01.014>

Massicotte P, Asmala E, Stedmon CA & Markager S (2017) Global distribution of dissolved organic matter along the aquatic continuum: across rivers, lakes and oceans. *Science of the Total Environment* 609:180-191 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.076>

Sinha RP, Klisch M, Gröninger A & Häder D-P (1998) Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 50: 83-94. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00198-5](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00198-5)

Stedmon CA, Markager S, Søndergaard M, Vang T, Laubel A, Borch NH & Windelin A (2006) Dissolved organic matter (DOM) export to a temperate estuary: Seasonal variations and implications of land use. *Estuaries and Coasts* 29: 388-400.

Stedmon CA, Markager S, Tranvik L, Kronberg L, Slätis T & Martinsen W (2007) Photochemical production of ammonium and transformation of dissolved organic matter in the Baltic Sea. *Marine Chemistry* 104: 227-240.
<https://doi.org/10.1016/j.marchem.2006.11.005>

Bilag 1

Bestilling til DCE

Miljøstyrelsen har i samarbejde med AU udarbejdet vedlagte marine parallelprøvnings-program for TN, der dækker perioden 1. maj 2018 – 30. april 2019 (bilag 1 samt kort nederst). Programmet indeholder prøvetagningsstationer og prøvetagningsdybder fra det eksisterende NOVANA-program.

AU bedes bekræfte, at programmet kan danne grundlag for korrektion af de marine TN-analyser.

På baggrund af ovenstående bedes AU udarbejde tilbud på følgende:

- Statistisk dataanalyse med henblik på at opstille formler for korrektion af marine TN-data fra 2007-2017, hvori indgår årstidsvariation og geografisk variation.
- Rapportering af ovenstående, som skal foreligge senest 1. juni 2019. Miljøstyrelsen forudsætter, at der kan foretages en kvartalsvis dataanalyse. Umiddelbart efter rapporteringen skal selve korrektionen af de marine data foretages efter nærmere aftale med Miljøstyrelsen.

Miljøstyrelsen forudsætter, at AU koordinerer den anvendte statistiske metode på det marine område med det ferske område, hvor der også foretages datakorrektion og koordination med DTU.