

NOVANA

Teknisk anvisning for marin overvågning

5.1 Intern belastning

Henrik Fossing
Peter Bondo Christensen
Tage Dalsgaard
Søren Rysgaard
Nils Risgaard-Petersen
Afdeling for Marin Økologi

Miljøministeriet
Danmarks Miljøundersøgelser

Indhold

5.1	Sediment – intern belastning	5.1-4
5.1.1	Indledning	5.1-4
5.1.2	Formål	5.1-4
5.1.3	Kriterier for fastlæggelse af stationer	5.1-5
5.1.4	Principper for stofomsætning i havbunden	5.1-5
5.1.4.1	Mineralisering af organisk stof	5.1-6
5.1.4.2	Næringssaltenes mobilisering – intern belastning	5.1-7
5.1.4.2.1	Kvælstof	5.1-9
5.1.4.2.2	Fosfor	5.1-10
5.1.4.2.3	Fosfat og jern	5.1-11
5.1.4.3	NOVANA og monitorering af intern belastning	5.1-11
5.1.4.3.1	Stofomsætning og næringsstoffluxer af N og P mellem vandsøjlen og havbunden	5.1-11
5.1.5	Prøvetagning	5.1-12
5.1.5.1	Indsamling, transport og opbevaring af vand og sediment	5.1-13
5.1.5.1.1	<i>In situ</i> måling af ilt, temperatur, salinitet og lys	5.1-13
5.1.5.1.2	Præinkubation	5.1-14
5.1.5.2	Prøvetagningsfrekvens	5.1-16
5.1.6	Analysemetoder: Ilt- og næringsstoffluxer	5.1-16
5.1.6.1	Præ-inkubation ved <i>in situ</i> temperatur, lys og ilt	5.1-16
5.1.6.1.1	Vurdering af inkubationstiden	5.1-18
5.1.6.1.2	Inkubation og prøvetagning i lys	5.1-20
5.1.6.2	Inkubation og prøvetagning i mørke	5.1-21
5.1.6.3	Analyser	5.1-22
5.1.6.3.1	Ilt	5.1-22
5.1.6.3.2	Orthofosfat	5.1-22
5.1.6.3.3	Nitrat og nitrit	5.1-22
5.1.6.3.4	Ammonium	5.1-23
5.1.6.4	Beregninger af ilt- og næringsstofkoncentrationer til brug for fluxberegning	5.1-23
5.1.7	Kvalitetssikring og dataindberetning	5.1-24
5.1.7.1	Kvalitetssikring	5.1-24
5.1.7.2	Observationer og indberetning af A- og B-data	5.1-26
5.1.7.2.1	Side 1 - Station og generelle oplysninger i forbindelse med prøvetagningen	5.1-26
5.1.7.2.2	Side 2 - Beskrivelse af sedimentoverfladen	5.1-27
5.1.7.2.3	Side 3 - Sedimentzonering	5.1-28
5.1.7.2.4	Side 4 og 5 - Ilt- og næringsstoffluxer (1) og (2)	5.1-29
5.1.8	Referencer	5.1-29

Bilag 5.1.1	Titrimetrisk bestemmelse af opløst ilt (O ₂) i vand (Winkler titrering)	5.1-31
Bilag 5.1.2	Fotometrisk bestemmelse af orthofosfat (PO ₄ ³⁻) i vand	5.1-36
Bilag 5.1.3	Fotometrisk bestemmelse af nitrit (NO ₂ ⁻) og nitrat (NO ₃ ⁻) i saltvand	5.1-41
Bilag 5.1.4	Fotometrisk bestemmelse af ammonium (NH ₄ ⁺) i saltvand	5.1-46
Bilag 5.1.5	Observationsskemaer	5.1-50

5.1 Sediment – intern belastning

5.1.1 Indledning

Planternes produktion af organisk stof, primærproduktionen, er grundlaget for livet i havet. Ved fotosyntese assimilerer planterne kuldioxid (CO₂), samtidig med at de optager og indbygger uorganiske næringssalte (bl.a. kvælstof og fosfor) i organiske forbindelser.

Det organiske stof "vandrer" gennem fødekæderne. Og i havet vil en stor del af stofproduktionen før eller siden havne på havbunden enten som levende eller dødt materiale. Her bliver det organiske materiale omsat gennem en række stofskifteprocesser, hvorved de bundne næringssalte frigives. Denne frigivelse af næringsstoffer kaldes for intern belastning. Næringssaltene kan nu give ophav til en ny primærproduktion enten i vandsøjlen eller på sedimentets overflade. Nedbrydningen af det organiske stof sker under forbrug af ilt. Jo større stofmængde, der tilføres havbunden, jo større mængder ilt går der til nedbrydningen. En stor stoftilførsel kan derfor medføre dårlige iltforhold i bundvandet og reducerede forhold i sedimentet.

I modsætning til vandsøjlen er sedimentet områdespecifikt, dvs., at det samme stykke fjord- eller havbund kan studeres år efter år. Da sedimentet reflekterer de produktionsforhold, der eksisterer i vandsøjlen, kan man få et billede af forandringerne i havmiljøet ved at følge sedimentets tilstand gennem flere år. I sedimentationsbassiner er det endvidere muligt at bestemme, hvor meget materiale der sedimenterer på og akkumulerer i havbunden. På den måde kan man bestemme, hvor mange næringsstoffer der forsvinder ud af kredsløbet og deponeres i havbunden.

Hav- og fjordbunden er altså et særdeles vigtigt element i de marine økosystemer, og bestemmelsen af den interne belastning bidrager med værdifuld information ved den samlede opgørelse af næringsstofbelastningen af marine systemer.

5.1.2 Formål

Ved at inddrage omfanget af den interne belastning i NOVANA-overvågningsprogrammet er det målet at eftervise ændringer i belastningsforhold samt biologiske og fysiske forhold i vandsøjlen. Gennem en langsigtet planlægning, hvor målinger, evt. suppleret med modelberegninger, af den interne belastning over en årrække sammenholdes med ændringer i den eksterne belastning, er det målet at skabe et tilstrækkeligt datasæt og dermed statistisk grundlag til at forudsige sedimentets kvantitative respons på ændringer i den eksterne næringsstofbelastning. Der arbejdes løbende på udvikling af modeller for sedimentets iltoptagelse og næringsstofudveksling, som er dynamisk koblet med den ovenstående vandsøjles biologi, kemi og

fysik. På kortere sigt vil overvågningen af den interne belastning give en kvalitativ vurdering af sæsonændringerne i et givet område, med den "støj", som varierende meteorologiske og hydrografiske forhold i øvrigt må påføre målingerne. Data fra områder med forskellig belastningsforhold og hydrografi vil gøre det muligt at vurdere forandringer i sedimentets oxidative tilstand, betydningen af stofmineraliseringen for iltforholdene i bundvandet og for sedimentet som intern næringskilde i kystnære danske farvande.

5.1.3 Kriterier for fastlæggelse af stationer

Intern belastning måles i udvalgte niveau 2+ kystområder. I hvert af områderne placeres 1-3 stationer afhængig af om der også foretages modellering af den interne belastning. Stationerne placeres, så de samlet set repræsenterer området bedst muligt. På landsplan bør valget af niveau 2+ områderne også tilgodes, at så mange forskelligartede kystområder som muligt repræsenteres, for på den måde at opnå et bredt billede af den intern belastnings omfang og betydning i danske kystvande. Stationsudvælgelsen foretages i samarbejde mellem amterne og DMU.

I niveau 2+ kystområderne skal placeringen af stationerne vælges sådan, at det ud fra mindst tre stationer er muligt at beskrive evt. ændringer for en betydende del af typeområdet, ud fra de variationer i ilt- og næringsstoffluxer der observeres inden for undersøgelsens 6-årige periode (dvs. 20 fluxmålinger i løbet af to på hinanden følgende år).

I forbindelse med indsamlingen af sedimentet anbefales det at føre en log-bog over prøvetagningen, hvor man udover en beskrivelse af sedimentet også noterer meteorologiske observationer samt vand-søjlets fysik (se *afsnit 5.1.7.2* og *Bilag 5.1.5*).

5.1.4 Principper for stofomsætning i havbunden

Mængden af kulstof (C), kvælstof (N) og fosfor (P) i de organiske molekyler varierer naturligvis; men oftest kan man angive CNP-forholdet i et "gennemsnitsmolekyle" ved Redfield's ratio: 106:16:1, og sammensætningen af det organiske stof kan derfor beskrives som $(\text{CH}_2\text{O})_{106}(\text{NH}_3)_{16}(\text{H}_3\text{PO}_4)$. Tilgængeligheden af henholdsvis fosfor og kvælstof bestemmer derfor, hvilket af de to næringsalte der begrænser produktionen.

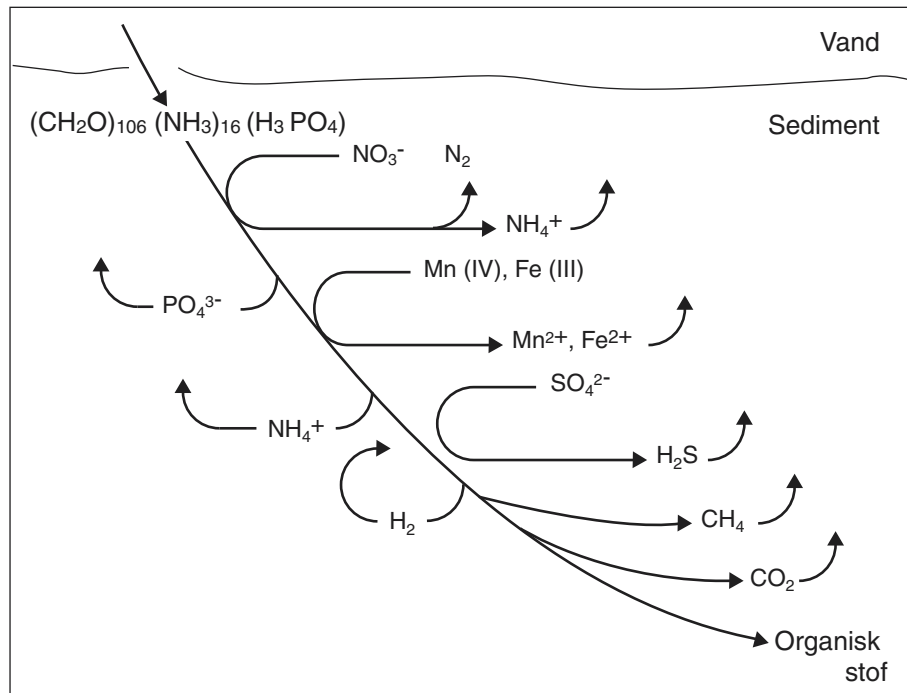
I de følgende afsnit beskrives, hvordan mineraliseringen af organisk stof og mobiliseringen af næringsalte varierer gennem året. I tilknytning hertil diskuteres, hvordan intern belastning indgår i sedimentovervågningen.

5.1.4.1 Mineralisering af organisk stof

Allerede mens det organiske stof synker gennem vandsøjlen, begynder omsætningen af det organiske materiale. Hydrolytiske enzymer, der udskilles fra mikroorganismer, nedbryder de organiske makromolekyler, og C-, N- og P-forbindelserne frigøres i form af mindre organiske forbindelser. Bakterierne kan optage de små forbindelser over deres cellemembran og bruge dem i cellens stofskifte. I de lavvandede, kystnære farvande foregår den største del af omsætningen dog i sedimentet.

Så længe der er ilt tilstede, foregår nedbrydningen af det organiske materiale ved en respiration med ilt. Der er typisk ilt til stede i vandsøjlen og i de øverste mm af sedimentet, og når ilten forsvinder, fortsætter mineraliseringen ved anoxiske respirationsprocesser (dvs. ånding uden ilt). I sedimentet er der en karakteristisk dybdefordeling af respirationsprocesserne, hvor åndingen med ilt sker i de øverste få mm; herefter følger respirationen med henholdsvis nitrat, oxideret jern og mangan, sulfat og længst nede i sedimentet sker omsætningen af organisk materiale som en forgæring, hvorved der dannes metan (*Figur 5.1.1*). Ved respirationsprocesserne opbruges de enkelt respirationsmidler, og det er årsagen til, at de findes i afgrænsede dybdeintervaller i sedimentet. Om vinteren, hvor stofomsætningen er lav, kan ilt nedtrængningen i sedimentet være op til 10 mm. Om sommeren trænger ilt typisk kun 2-3 mm ned i sedimentet. Nitrat når ganske få mm dybere ned i sedimentet end ilt og forsvinder altså også inden for den øverste cm. I modsætning hertil trænger sulfat så langt ned som 1 - 4 m i sedimentet (afhængig af den organiske belastning).

Op til halvdelen af det organiske materiale omsættes i sedimentet ved en respiration med ilt. Den øvrige del omsættes ved anaerob respiration. Den bakterielle respiration med sulfat (sulfatreduktionen) er den kvantitativt vigtigste anaerobe respirationsproces, og sulfatreduktionen kan oxidere 40-90% af det organiske materiale i danske farvande. Sulfatreduktionens store kvantitative betydning skyldes de høje sulfatkoncentrationer i havvandet, hvor koncentrationen af sulfat typisk er 150 gange højere end koncentrationen af ilt. I sammenligning med ilt- og sulfat-respirationen er respirationen med NO_3^- (denitrifikation) i hav- og brakvandsområder uden større kvantitativ betydning for mineraliseringen af det organiske stof. Denitrifikationsprocessen har derimod stor betydning for fjernelsen af kvælstof fra systemet.



Figur 5.1.1 Kaskaden af mikrobielle nedbrydningsprocesser i sedimentet, hvor organisk stof omsættes ved aerob og anaerob respiration samt forgæring. Bemærk at Mn(IV) og Fe(III) er partikulære forbindelser, mens de øvrige uorganiske forbindelser er gasser eller ioner. Omsætningen med ilt øverst i sedimentet er ikke vist (se også Tabel 5.1.1).

Den anoxiske mineralisering sker altså uden et forbrug af ilt. Men de reducerede produkter, der er et resultat af de anaerobe processer, forbruger imidlertid ilt, når de atter oxideres (Tabel 5.1.2). Eksempelvis bruges der meget ilt til at oxidere svovlbrinte (H_2S), der er slutproduktet ved sulfatreduktionen. Men dette iltforbrug kan forsinkes i måneder eller år på grund af forskellige kemiske og fysiske forhold i havbunden. Svovlbrinte binder sig fx til jernforbindelser i sedimentet og kan i lang tid ligge bundet som jernsulfider, før det atter en dag oxideres.

Det organiske stof bliver sjældent fuldstændigt omsat i sedimentet. Afhængig af tilførslen til overfladelaget, nedbrydeligheden af det organiske stof samt tilgængeligheden af åndingsmidlerne, mineraliseres en varierende mængde af det organiske materiale. Det organiske materiale, der ikke mineraliseres fuldstændigt, begravnes eller deponeres i sedimentet og forsvinder på den måde ud af stofkredsløbene sammen med de indbyggede næringsstoffer.

5.1.4.2 Næringsaltenes mobilisering – intern belastning

Ved nedbrydningen af det organiske stof i vandsøjlen og havbunden frigives næringsstofferne atter, hvorved de kan understøtte ny alge- og planktonproduktion (Tabel 5.1.1). Denne tilførsel af næringsstoffer til vandsøjlen kaldes intern belastning i modsætning til ekstern belastning, der betegner næringsstofftilførslen fra land. Benthiske alger,

der lever på sedimentoverfladen og dyr, der lever i de øverste cm af sedimentet, har stor indflydelse på stofomsætningen og på den mængde næringsalte, der frigives fra havbunden.

Tabel 5.1.1 Støkiometrisk sammenhæng ved nedbrydningen (mineraliseringen) af organisk stof (CH₂O)₁₀₆(NH₃)₁₆(H₃PO₄) ved respiration og forgæring.

aerob mineraliseringsproces	
respiration med ilt	
$(\text{CH}_2\text{O})_{106}(\text{NH}_3)_{16}(\text{H}_3\text{PO}_4) + 106\text{O}_2 + 13\text{H}^+ \rightarrow$	
$106\text{CO}_2 + 16\text{NH}_4^+ + \text{PO}_4^{3-} + 106\text{H}_2\text{O}$	Eq. 1
anaerobe mineraliseringsprocesser	
respiration med nitrat (denitrifikation)	
$(\text{CH}_2\text{O})_{106}(\text{NH}_3)_{16}(\text{H}_3\text{PO}_4) + 84^{4/5}\text{NO}_3^- + 84^{4/5}\text{H}^+ \rightarrow$	
$106\text{CO}_2 + 16\text{NH}_4^+ + \text{PO}_4^{3-} + 42^{2/5}\text{N}_2 + 148^{2/5}\text{H}_2\text{O}$	Eq. 2
respiration med jern(hydr)oxid (jernreduktion)	
$(\text{CH}_2\text{O})_{106}(\text{NH}_3)_{16}(\text{H}_3\text{PO}_4) + 424\text{FeOOH} + 848\text{H}^+ \rightarrow$	
$106\text{CO}_2 + 16\text{NH}_4^+ + \text{PO}_4^{3-} + 424\text{Fe}^{2+} + 742\text{H}_2\text{O}$	Eq. 3
respiration med manganoxid (manganreduktion)	
$(\text{CH}_2\text{O})_{106}(\text{NH}_3)_{16}(\text{H}_3\text{PO}_4) + 212\text{MnO}_2 + 242\text{H}^+ \rightarrow$	
$106\text{CO}_2 + 16\text{NH}_4^+ + \text{PO}_4^{3-} + 212\text{Mn}^{2+} + 318\text{H}_2\text{O}$	Eq. 4
respiration med sulfat (sulfatreduktion)	
$(\text{CH}_2\text{O})_{106}(\text{NH}_3)_{16}(\text{H}_3\text{PO}_4) + 53\text{SO}_4^{2-} + 119\text{H}^+ \rightarrow$	
$106\text{CO}_2 + 16\text{NH}_4^+ + \text{PO}_4^{3-} + 53\text{H}_2\text{S} + 106\text{H}_2\text{O}$	Eq. 5
forgæring (metandannelse)	
$(\text{CH}_2\text{O})_{106}(\text{NH}_3)_{16}(\text{H}_3\text{PO}_4) + 13\text{H}^+ \rightarrow$	
$53\text{CO}_2 + 53\text{CH}_4 + 16\text{NH}_4^+ + \text{PO}_4^{3-}$	Eq. 6

Bentiske mikro- og makroalger på sedimentoverfladen påvirker iltforholdene og dermed stofomsætningen gennem deres fotosynteseaktivitet. Mikroalger kan danne tætte bevoksninger ud på store vanddybder (ned til 20 m), hvor de selv ved små lysintensiteter kan producere organisk stof. Iltproduktionen i lys giver en dybere ilt- nedtrængning i dagtimerne og dermed mulighed for en større stofomsætning med ilt. Samtidig opsuger algerne næringsalte (N og P), der diffunderer op fra de underliggende sedimentlag. Algerne fungerer dermed som et effektivt filter, der reducerer eller stopper næringsstoffrigivelsen fra sedimentet, og der igennem påvirker de også omfanget af den interne belastning. Algernes assimilering af næringsalte under primærproduktionen betyder, at sedimentet kan udvise en nettooptagelse af næringsalte. Selv om der er en stor mi-

neralisering af næringssalte i sedimentet, kan algerne altså også optage næringssalte fra vandsøjlen, når de er mest aktive.

Måtter af makroalger har samme effekt på næringsstoffluxen, men makroalgerne er ofte mere ustabile samfund, der giver store fluktuationer i iltforhold og dermed næringsstoffdynamikken i bundvandet. I de tykke måtter er der ofte iltfrie forhold i bunden af måtten. Det betyder, at sedimentoverfladen ofte er reduceret, og at svovlbrinte dermed kan nå helt op til sedimentoverfladen. Når måtten forsvinder eller falder sammen, forsvinder filtereffekten også, og svovlbrinte og næringssalte kan momentant frigives til vandsøjlen.

Dyr, der graver i sedimentet (bioturbation), har ligeledes stor indflydelse på stofomsætningen og næringsstoffrigivelsen. Dyrene pumper iltrigt vand dybt ned i sedimentet og forøger dermed iltrespirationen i sedimentet. Deres graveaktivitet betyder også, at reducerede forbindelser bringes op til sedimentoverfladen, hvor de bliver oxideret. Endelig har en stor population af infauna indflydelse på fluxen af ammonium og urea, da deres ekskretionsprodukter er rig på disse forbindelser.

5.1.4.2.1 Kvælstof

Kvælstof mobiliseres fra den partikulære organiske stofpulje primært i form af ammonium (NH_4^+), som frigøres relativt hurtigt fra sedimentet. Ammonium kan frigives til vandsøjlen eller blive oxideret til nitrat (NO_3^-) af nitrificerende bakterier afhængig af iltforholdene i de øverste mm af sedimentet. Tilsvarende kan nitrat frigives til vandsøjlen eller være oxidationsmiddel for denitrifikationsprocessen, som finder sted i lagene lige under den iltede overfladezone (Figur 5.1.2). Både ammonium og nitrat kan endvidere assimileres af bentiske mikroalger, der lever på sedimentoverfladen.

I forårsperioden stimulerer de gode iltforhold i sedimentet nitrifikationsprocessen ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$), og på denne årstid øges eksporten af nitrat fra sedimentet. Med tiltagende forringelse af sedimentets iltindhold i løbet af sommeren øges ammoniumfluxen fra sedimentet, og NH_4^+ er på dette tidspunkt den mest betydende kvælstofforbindelse, der eksporteres til vandfasen. I vinterperioden er mineraliseringen karakteristisk lav, og iltindholdet øges atter i sedimentet, og NO_3^- -fluxen bliver igen en betydende kvælstofkilde fra sediment til vandfasen. Kvælstofudvekslingen mellem sedimentet og vandsøjlen er derfor resultatet af en kompleks ligevægt, der er bestemt af en række faktorer bl.a. tilførslen af organisk materiale til sedimentet, temperaturen, lysforholdene ved sedimentoverfladen og vandsøjlets indhold af ilt, ammonium og nitrat.

Tabel 5.1.2 Iltforbrugende oxidationsprocesser, der følger nedbrydningen af organisk stof.

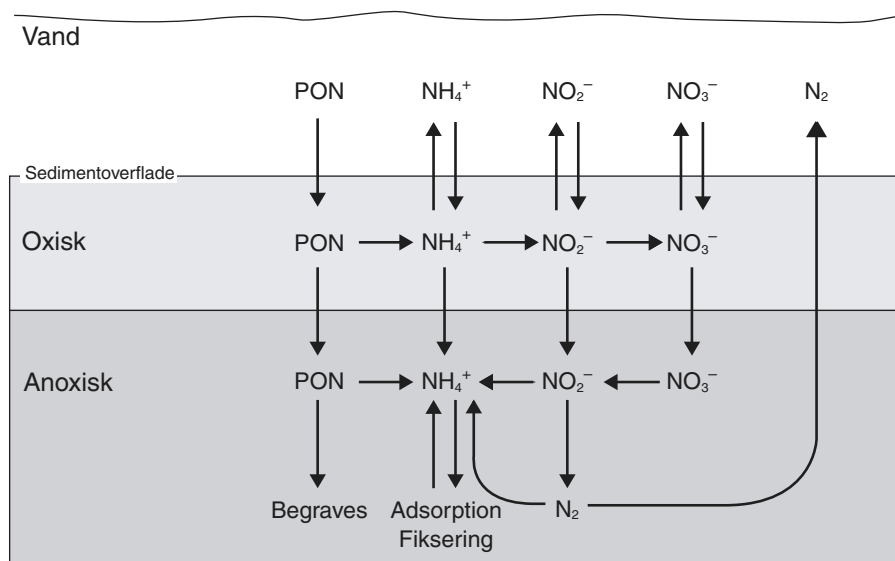
jernoxidation	$\text{Fe}^{2+} + \frac{1}{4}\text{O}_2 + 1\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeOOH} + 2\text{H}^+$	Eq. 7
manganoxidation	$\text{Mn}^{2+} + \frac{1}{2}\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MnO}_2 + 2\text{H}^+$	Eq. 8
ammoniumoxidation (nitrifikation)	$\text{NH}_4^+ + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$	Eq. 9
svovlbrinteoxidation	$\text{H}_2\text{S} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$	Eq. 10
metanoxidation	$\text{CH}_4 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	Eq. 11

5.1.4.2.2 Fosfor

Ved mineraliseringen frigives fosfor som uorganisk fosfor, orthofosfat (PO_4^{3-}). Ligesom ammonium optages fosfat direkte af alge- og planktonorganismerne; men modsat kvælstofsaltene kan fosfat bindes mere fast til sedimentet. Frigivelsen af fosfor kan derved forsinkes i op til flere måneder eller år.

Langt den overvejende del af sedimentets fosforindhold udgøres af orthofosfat, der enten er let bundet til oxiderede jern- eller manganforbindelser eller fast bundet til fx aluminiumoxider, lermineraller, magnesium eller calcium, hvorfra orthofosfat praktisk talt ikke frigives igen. Kun en kvantitativ ubetydelig del af det uorganiske fosfat

Figur 5.1.2 Sedimentets kvælstofkredsløb. PON og DON er henholdsvis partikulært og opløst organisk kvælstof.



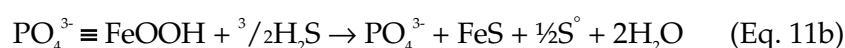
findes opløst i porevandet i de øverste få mm-cm af sedimentet. De miljømæssige forhold og reaktionsmekanismer, der påvirker mobiliseringen af det jernbundne fosfat, omtales i *afsnit 5.1.4.2.3*. I organisk form findes fosfor bundet i plantemateriale o.lign., hvorfra det enten ved nedbrydningen frigives som orthofosfat eller begravnes permanent i sedimentet som uomsætteligt organisk-P.

Iltforholdene i bundvandet har stor indflydelse på frigivelsen af kvælstof og fosfor. Dårlige iltforhold eller iltsvind giver en stærkt forøget frigivelse af næringssaltene. Specielt ser man i de lavvandede danske fjorde og kystvande typisk en markant fosforfrigivelse fra sedimentet i de varmeste sommermåneder. Det skyldes, at jernforbindelserne reduceres (se *afsnit 5.1.4.2.3*). Den forhøjede fosforfrigivelse afspejles ofte i forhøjede fosforkoncentrationer i vandsøjlen om sommeren.

5.1.4.2.3 Fosfat og jern

Sedimentets indhold af oxiderede jernforbindelser kan som nævnt bruges af bakterier som åndingsmiddel ved mineraliseringsprocesserne på linie med mangan, ilt, nitrat og sulfat (*Tabel 5.1.1* og *Figur 5.1.1*). De oxiderede jernforbindelser har imidlertid væsentlig større økologisk betydning gennem deres tilbageholdelse af svovlbrinte og fosfat i havbunden. Oxiderede jernforbindelser findes i partikulær form i havbundens øverste få cm, dvs. i og umiddelbart under havbundens iltede zone. Den brunlige farve, som ofte kendetegner sedimentets overfladelag, skyldes de oxiderede jernforbindelser.

Tilstedeværelsen af oxideret jern i sedimentet påvirker således frigivelsen af det orthofosfat, der mobiliseres ved mineraliseringsprocesserne. Fosfat binder sig nemlig til oxideret jern (Eq. 11a) og frigives først til den ovenstående vandfase, når det oxiderede jern reduceres (Eq. 11b). Fosfor afgives derfor primært i sensommeren og efteråret, hvor den oxiderede Fe-pulje er lavest pga. bindingen til svovlbrinte.



5.1.4.3 NOVANA og monitoring af intern belastning

Sedimentovervågningen inden for NOVANA omfatter både estuarine og marine sedimenter og fokuserer på den interne belastning med næringsalte fra bunden.

5.1.4.3.1 Stofomsætning og næringsstofflux af N og P mellem vandsøjlen og havbunden

Iltflux og stofomsætning

Sedimentets iltforbrug er helt afhængig af den mængde organisk stof, der sedimenterer og omsættes i havbunden. Ved at måle sedimentets iltoptagelse (iltflux) kan der derfor opnås værdifuld information om variationer af den organiske belastning i det pågældende sedimentområde.

Sedimentets iltoptagelse bliver ofte brugt til at beskrive omsætningen af organisk stof i sedimentet. Sammenhængen er imidlertid ikke helt simpel. Iltfluxen går både til den egentlige aerobe mineralisering (Eq. 1; Tabel 5.1.1) samt til oxidation af reducerede forbindelser dannet ved den anaerobe mineralisering; eksempelvis oxidationen af svovlbrinte til sulfat (Tabel 5.1.2). Sedimentets iltoptagelse beskriver altså både den aerobe og den anaerobe respiration. Sulfatrespirationen kan i flere tilfælde være den mest udbredte respirationsproces. Denne respiration efterfulgt af oxidationen af svovlbrinte kan udtrykkes som sumprocessen af Eq. 5 (Tabel 5.1.1) og Eq. 10 (Tabel 5.1.2). Man kan let se, at denne sum præcis svarer til støkiometrien for respirationen med ilt Eq. 1 (Tabel 15.1.1), og stofomsætningen ved brug af sulfat vil derfor også være beskrevet indirekte ved en måling af iltoptagelsen.

Havbundens totale iltoptagelse beskriver imidlertid kun sedimentets stofomsætning, hvis nedbrydningsprocesserne er i "steady state", dvs., at produktionen af de reducerede forbindelser balanceres af et tilsvarende iltforbrug. Man må imidlertid være opmærksom på, at oxidationsprocesserne (Tabel 5.1.2) kan være tidsforskuet i forhold til produktionen, med andre ord oparbejdes der i perioder af året (somerhalvåret) en "iltgæld" i sedimentet, som først indløses, når sedimentet oxideres i løbet af vinterhalvåret. Ved at anvende målinger af sedimentets iltoptagelse kan man derfor fejlestimere stofomsætningen. I den periode, hvor svovlbrinte bindes til sedimentets oxiderede jern, underestimeres mineraliseringen. Omvendt overestimeres mineraliseringen ved målinger af iltoptagelse i perioder, hvor reducerede forbindelser oxideres ved fx opblanding i vandsøjlen (resuspension). Angives den årlige stofomsætning som en middelværdi af hyppigt målte iltfluxe fordelt over året, kan fejlen på den beregnede værdi begrænses (afsnit 5.1.5 og 5.1.6).

Næringsstofflux og intern belastning (frigivelse af næringsalte)

Næringsalte, som frigives fra sedimentoverfladen, kan øge næringsstofbelastningen i vandsøjlen. Ved en vurdering af sedimentets betydning som næringskilde eksempelvis efter en reduktion af den eksterne belastning, kan man inddrage målinger af næringsstoffluxen mellem sediment og vandsøjlen. Da næringsstoffluxen ligesom iltforbruget er årstidsafhængig, må næringsstoffluxene måles med en frekvens, der er bestemt af omsætningshastigheden og dynamikken i det pågældende område (afsnit 5.1.5 og 5.1.6). Den målte frigivelse fra sedimentet må relateres til massebalancer for næringsstofferne import og eksport til og fra området.

5.1.5 Prøvetagning

Overvågningen af den interne belastning omfatter bestemmelsen af

- $(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)$ fluxen
- NH_4^+ fluxe

- PO_4^{3-} fluxe
- O_2 fluxe (et mål for sedimentets metabolisme)

5.1.5.1 Indsamling, transport og opbevaring af vand og sediment

Sedimentkernerne indsamles i rengjorte (syrevaskede) plexiglasrør (300 mm lange, 52 mm (ID), 4 mm vægtykkelse) direkte fra hav/fjordbunden af dykker eller i lavvandede områder til fods. Hvor prøvetagningen ikke kan udføres af dykker, kan sedimentet indsamles fra skib/båd ved brug af Kajakbundhenter, "Haps", Boxcorer eller lignende, hvorfra de egentlige sedimentprøver udtages. Ved håndteringen af plexiglasrør til ilt- og fluxmålinger skal der anvendes gummihandsker eller lign., således at ammonium fra huden ikke forurener sedimentprøverne. Der udtages et tilstrækkeligt stort antal sedimentkerner, så det er muligt at fravælge "forstyrrede" sedimentprøver, dvs. sedimentkerner, der indeholder større dyr, sten, skaller eller lignende. Ved stationsvalget skal man undgå områder med makrofytbevoksninger, der virker forstyrrende på målingerne. Sker det, at stationen alligevel i løbet af sommerhalvåret bevokses med makrofytter, skal man finde "en bar plet" og tage sedimentprøverne der.

Det er vigtigt, at sedimentet indsamles så uforstyrret som muligt, særligt skal det undgås, at overfladesedimentet hvirvles op under prøvetagningen og den efterfølgende transport. For at mindske opblanding af sedimentet under transporten fyldes plexiglasrøret over sedimentkernen helt op med bundvand og tillukkes med gummi-prop, uden at der fanges luftbobler under proppen. Placér evt. en flaminco-plade på vand- eller sedimentoverfladen inden plexiglasrøret fyldes med vand, herved hindres sedimentet i at blive hvirvlet op ved påfyldningen. Sedimentkernerne skal transporteres i en termokasse, hvor temperaturen holdes nær (evt. lidt lavere end) *in situ* temperaturen, for ikke at øge hastigheden af de metabolske og kemiske processer i sedimentet.

På stationen indsamles tilstrækkeligt med bundvand, hvori prøverne kan opbevares/præ-inkuberes, før analyseprogrammet startes. Ved bundvand forstås i denne sammenhæng vand med samme iltkoncentration og næringssaltindhold som umiddelbart over bunden, således at sedimentkernerne kan (præ)inkuberes i vand ved *in situ* ilt- og næringssaltkoncentration. Vandet indsamles med vandhenter, pumpe, med dykker eller "til fods", så tæt ved bunden som muligt uden at få sediment i vandet.

5.1.5.1.1 *In situ* måling af ilt, temperatur, salinitet og lys

For at kunne opbevare sedimentkernerne ved *in situ* lignende betingelser er det nødvendigt at kende iltkoncentration og temperatur i det bundnære vand. Sediment til ilt- og næringsstoffluxe skal endvidere inkuberes ved *in situ* lyspåvirkning.

Iltkoncentrationen udtrykkes ved gennemsnittet af tre vandprøver, bestemt ved Winkler-titrering. I "felten" tilsættes Winkler-reagens I og II til vandprøverne, som efterfølgende titreres hjemme i laborato-

riet (se *Bilag 5.1.1* Titrimetrisk bestemmelse af opløst ilt (O₂) i vand). Alternativt kan iltkoncentrationen måles med en iltelektrode evt. monteret på en CTD-sonde.

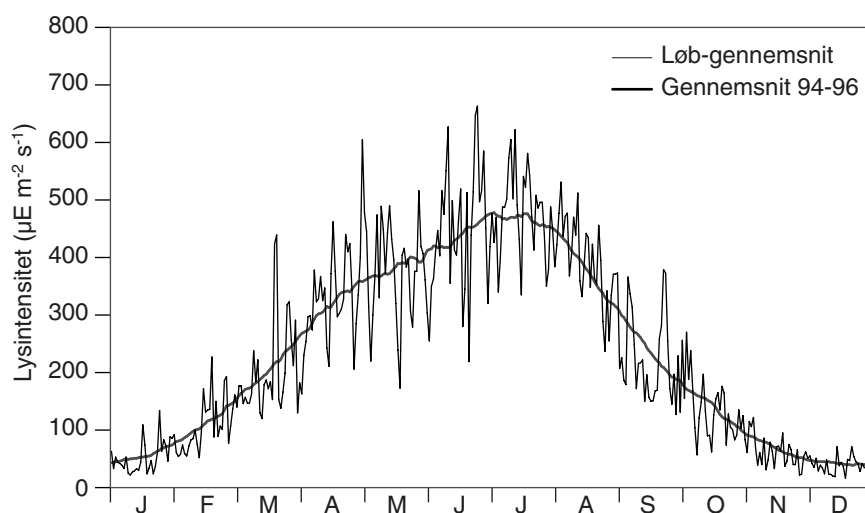
Temperaturen i bundvandet måles *in situ* med et almindeligt termometer ($\pm 1/2^\circ\text{C}$) eller ved at måle temperaturen i det bundvand, der indsamles med Kajakbundhenter eller vandhenter. Alternativt kan temperaturen måles med CTD-sonde.

Salinitet beregnes ud fra vandets ledningsevne og temperatur og måles med CTD-sonde eller ved ledningsevnebestemmelse i en bundvandsprøve hentet op med sedimentkernen eller vandhenter. Alternativt kan salinitet i bundvandet bestemmes ved brug af et refraktometer.

Lysintensiteten, udtrykt i $\mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($= \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), måles samtidig ved både sedimentoverfladen og lige over havoverfladen. Den gennemsnitlige lysintensitet bestemmes over et tilpas langt tidsrum, så både sol- og skyggeperioder indgår i beregningen. Ud fra lysmålingerne beregnes den procentuelle lyssvækkelse i vandsøjlen på prøvetagningsdagen (se også Kap. 1.3 Lyssvækkelse i Del 1 Elektroniske målinger). Lysforholdene på stationen er imidlertid meget afhængige af "vejr og vind" og derfor anvendes en standard "in situ" lysintensitet ved inkubationerne, der afhænger af den målte lyssvækkelse og den gennemsnitlige solindstråling den pågældende uge. Lysintensiteten, der skal anvendes ved inkubationerne, beregnes ved at multiplicere den målte procentuelle lyssvækkelse med den i *Tabel 5.1.3* angivne lysintensitet for den pågældende uge. Den ugentlige lysintensitet, der er opført i *Tabel 5.1.3*, er midlet ud fra timeobservationer af solindstrålingen ved Forsøgscenter Foulum for perioden 1.1.94 til 31.12.96 (*Figur 5.1.3*).

5.1.5.1.2 Præinkubation

Tillukningen under transporten har formodentlig medført, at iltindholdet i både vand og overfladesediment er blevet reduceret i forhold til *in situ*. Af hensyn til det efterfølgende analyseprogram er det derfor vigtigt, at sedimentkernerne umiddelbart efter transporten får lov til at "falde til ro" i inkubationskammeret, mens iltforholdene genoprettes - denne periode kaldes præinkubationen og skal påbegyndes hurtigst muligt (senest 3-5 timer), efter at sedimentkernerne er indsamlet.



Figur 5.1.3 Den daglige lysintensitet, $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (kraftig linie) beregnet fra solopgang til solnedgang som "løbende gennemsnit" af 30 dagobservationer. Dagobservationerne (tynde linie) er beregnet som middelværdien af timeobservationer af solindstrålingen ved Forsøgscenter Foulum i perioden 1.1.94 til 31.12.96.

Inden sedimentkerner med ovenstående vandfase anbringes i inkubationskammeret, rengøres ydersiden af røret forsigtigt med vandhanevand. Herefter fjernes den øverste gummiprop. Sedimentet positioneres vha. et stempel indsat i bunden af røret, så sedimentetoverfladen er ca. 20 cm fra den øverste kant af plexi-glasrøret (se Figur 5.1.5). For at tillade en tilstrækkelig udveksling af vandet over sedimentoverfladen i disse "fluxrør" er det nødvendigt at indsætte en lille

Tabel 5.1.3 Standardlysintensiten, $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for årets uger beregnet ved at midle indstrålingen opgjort på dag- og timebasis over en treårig periode ved Forsøgscenter Foulum for perioden 1.1.94 til 31.12.96 (se Figur 5.1.3).

uge nr.	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	uge nr.	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	uge nr.	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	uge nr.	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
1	45	14	277	27	472	40	170
2	50	15	307	28	470	41	156
3	55	16	329	29	471	42	133
4	67	17	347	30	456	43	112
5	79	18	363	31	444	44	93
6	95	19	369	32	414	45	81
7	111	20	383	33	381	46	68
8	128	21	397	34	342	47	57
9	152	22	404	35	314	48	49
10	174	23	418	36	280	49	45
11	195	24	428	37	250	50	43
12	222	25	451	38	216	51	40
13	250	26	468	39	192	52	40

magnet i et ophæng i hvert rør til omrøring og udskiftning af vandfasen mellem rør og inkubationskammer. Sedimentkernerne anbringes under vand i inkubationskammeret (se *Figur 5.1.4*) under *in situ* lysbetingelser. De egentlige fluxmålinger startes dagen efter indsamlingen.

Vandet i inkubationskammeret skal have *in situ* temperatur og en "passende" *in situ* iltkoncentration før sedimentkernerne anbringes. Den "passende" iltkoncentration opnås i praksis ved at gennemboble bundvandet ved hjælp af en eller flere luftsten med standardblandinger af luft, der fortyndes med N₂ indeholdende 0,03% CO₂. Inkubationerne foretages ved 100%, 50%, 20% eller 0% luftmætning eller ved den "sande" *in situ* luftmætning ved brug af en gasblander (se *afsnit 5.1.6*). Hvis iltindholdet i vandet er under atmosfærisk mætning, placeres et flydelåg på inkubationskammerets vandoverflade for at mindske udvekslingen mellem luft og vand.

5.1.5.2 Prøvetagningsfrekvens

Ilt- og næringsstoffluxe, måles kun måles i udvalgte niveau 2+ kystområder, hvor målingerne udføres 10 gange pr. år over en sammenhængende periode på 2 år. Prøvetagningen foretages ikke nødvendigvis "jævnt fordelt" over året, men således, at sedimentomsætningen i det pågældende område repræsenteres bedst muligt. På hver station indsamles 6 sedimentkerner, hvoraf de 5 inkuberes ved *in situ* temperatur, lys og ilt, den sjette sedimentkerne testinkuberes ved *in situ* temperatur og ilt, men i mørke med henblik på at bestemme længden for den egentlige inkubation (se *afsnit 5.1.6.1.1*). Det skal bemærkes, at sediment, der *in situ* påvirkes af lys, først skal inkuberes i lys og derefter i mørke (fluxmålingerne udføres altså på samme sedimentkerner).

5.1.6 Analysemetoder: Ilt- og næringsstoffluxe

På de valgte stationer i niveau 2+ områderne bestemmes fluxe af orthofosfat, nitrat, nitrit og ammonium ved at måle den tidsafhængige koncentrationsændring i et "lukket" vandvolumen over et veldefineret sedimentareal. På samme måde måles sedimentets metabolisme udtrykt ved iltoptaget. På sediment, der *in situ* påvirkes af lys, skal ilt- og næringsstoffluxe måles i de samme sedimentkerner, først i lys og derefter i mørke. Hvert område repræsenteres ved mindst tre stationer. For at kunne sammenligne observationer inden for selve niveau 2+ området og områderne imellem, bør det tilstræbes, at alle ilt- og fluxmålinger i området foretages samme dag, og at alle niveau 2+ områderne undersøges indenfor samme 2-årige periode.

5.1.6.1 Præ-inkubation ved *in situ* temperatur, lys og ilt

Fra hver station indsamles 6 sedimentkerner i Kajak-rør, som straks efter ankomsten til laboratoriet anbringes i bundvand fra stationen i inkubationskammer (*Figur 5.1.4*) sammen med 3 vandfyldte rør (kontrol-rør) ved *in situ* temperatur, lys og ilt. Vandet overføres fra

transportbeholderne til inkubationskammeret vha. en hævert, som stikkes helt ned til bunden af inkubationskammeret. Herved undgås unødigt beluftning af bundvandet, som vil påvirke iltindholdet, specielt i de tilfælde hvor bundvandet er undermættet med luft. Ved håndteringen af rør, inkubationskammer og inkubationsvand skal der anvendes gummihandsker eller lign., således at ammonium fra huden ikke forurener vandprøverne.

Ydersiden af de tilproppede sedimentkerner rengøres omhyggeligt med vandhanevand og den øverste gummiprop fjernes. Af hensyn til den efterfølgende fluxmåling positioneres sedimentoverfladen 20 cm fra den øverste kant af plexiglasrøret, hvilket giver ca. 425 ml vand i Kajak-røret over sedimentet. I kontrolrørerne anbringes en falsk bund (fx et stempel) i samme position som sedimentoverfladen. En lille Teflon-coated magnet (30 mm x 5 mm, ID) til omrøring og udskiftning af vandfasen mellem rør og inkubationskammer ophænges i hvert rør, 5 cm fra sedimentoverfladen (Figur 5.1.5). Sedimentrørerne sænkes helt ned under vandoverfladen i inkubationskammeret.

Vandet i plexiglasrøret skal omrøres med en hastighed på 60 omdr. min^{-1} , hvilket resulterer i en tilstrækkelig blanding af vandvolumenet, uden at sedimentet hvirvles op. Ved brug af en eller flere luftsten gennembobles vandet i inkubationskammeret med luft med et passende iltindhold svarende den nærmeste *in situ* luftmætningsværdi: 100%, 50%, 20% eller 0% luftmætning (Tabel 5.1.4). Inkubationsvandet kan også gennembobles med den sande *in situ* luftmætning ved brug af en gasblander, der er istand til at opretholde et stabilt gasblandingsforhold over mindst et døgn. I dette tilfælde blandes to komprimerede gasser: atmosfærisk luft og N_2 indeholdende 0,03% CO_2 .

Tabel 5.1.4 Valg af gasblanding til beluftning af inkubationsvand. Bemærk at inkubationsvandet også kan beluftes ved *in situ* luftmætning vha. gasblander.

% luftmætning		gasblanding		
<i>in situ</i> interval	inkubation	CO_2	O_2	N_2
0 - 10%	0%	0,03%	0%	rest N_2 (\approx 99.97%)
10 - 35%	20%	0,03%	4,2%	rest N_2 (\approx 95.77%)
35 - 75%	50%	0,03%	10,5%	rest N_2 (\approx 89.47%)
75 - 100%	100%			akvariepumpe

For at mindske O_2 -udvekslingen mellem laboratorieluften og vandet, når luftmætningen i vandet er <100%, placeres yderligere et gennemsigtigt flydelåg på vandoverfladen i inkubationskammeret. I enkeltstående tilfælde, hvor luftmætningen i bundvandet overstiger 100% (i forbindelse med fotosyntese) præ-inkuberes sedimentkernerne ved 100% luftmætning uden flydelåg. Sediment, der *in situ* påvirkes af sollys, belyses "resten af dagen" med "koldtlys"lampe m/dagslysspektrum (fx Osram HQI-T 400 W/D) ved *in situ* lysintensitet (se Tabel 5.1.3), dvs. et slukur afbryder lyspåvirkningen af sedimentet på det tidspunkt af dagen, hvor solen går ned. Sedimentkernerne inku-

beres ved *in situ* temperatur i kølerum. For at undgå at varmestrålingen fra lyskilden opvarmer sediment og vand, kan det være nødvendigt at placere en vandkølet hærde glasplade mellem lampen og forsøgsopstillingen.

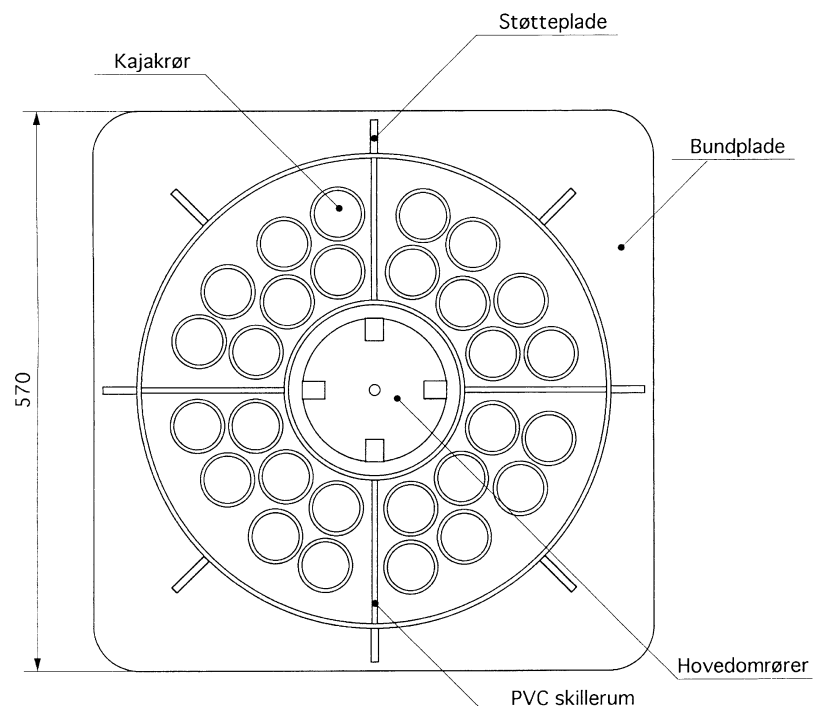
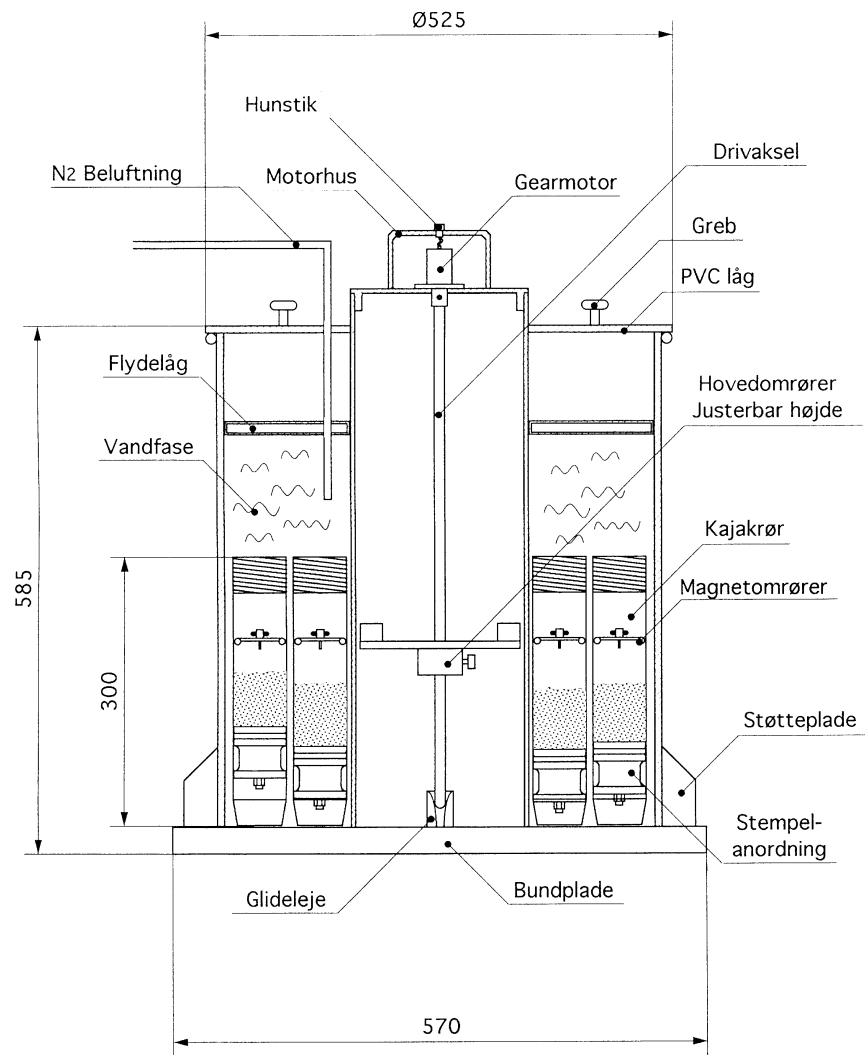
5.1.6.1.1 Vurdering af inkubationstiden

Længden af inkubationen skal afpasses således, at det er muligt at måle en signifikant ændring af ilt- og næringsstofkoncentrationen i løbet af inkubationen. Den valgte inkubationslængde vil derfor afhænge både af forholdene på den pågældende station (fx mængden af organisk stof), årstiden (temperaturen) og vandvolumenet over sedimentet.

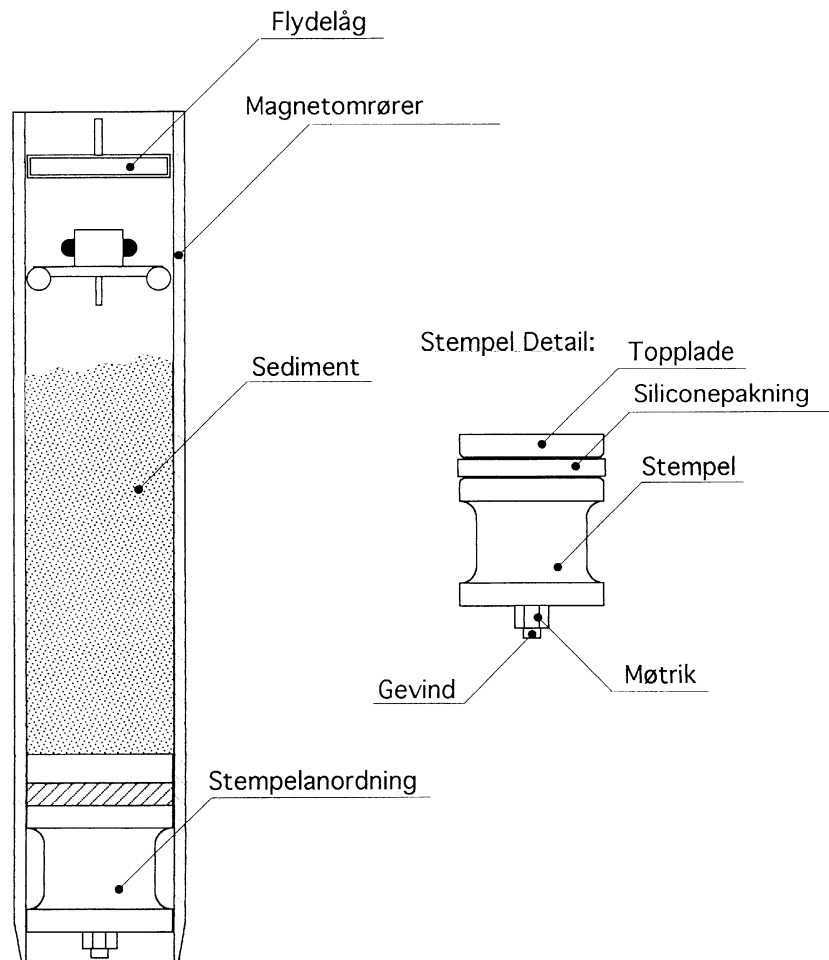
Ud over erfaring og data fra tidligere målinger af iltfluxe på stationen, vil en test-inkubation af én sedimentkerne oftest vise sig at være nødvendig for at kunne bestemme længden af den egentlige inkubation. Testinkubationen udføres i mørke dagen før eller evt. samtidig med den egentlige inkubation. Under test-inkubationen følges iltkoncentrationen i det tillukkede sedimentrør, som beskrevet nedenfor (5.1.8.1.2). Der udtages én vandprøve til iltkoncentrationsbestemmelse efter 2 timer og endnu én efter 4 timer. På basis af de to målinger samt iltkoncentrationen ved forinkubationens start beregnes iltoptaget pr. time. Tiden for den egentlige inkubation af de øvrige 5 sedimentrør kan på denne måde afpasses sådan, at inkubationen kan stoppes, efter at iltkoncentrationen er faldet til ca. 80% af startværdien. Det vil sige, inkuberes sedimentkernerne ved 100% luftmætning ved starten, skal inkubationen stoppes, når iltindholdet er faldet til 80% luftmætning, ved 50% luftmætning stoppes inkubationen ved 40%, og ved en startværdi på 20% luftmætning stoppes inkubationen ved 10-15%. Inkubationstiden kan i øvrigt påvirkes ved at ændre på højden af vandsøjlen. Reduceres fx vandsøjlen fra 20 cm til 10 cm, idet sedimentsøjlen og magneten skubbes 10 cm højere op i røret, inden det lukkes, halveres også inkubationstiden. Ved denne justering af inkubationstiden skal højden af vandsøjlen være mindst 10 cm \approx 210 ml vand. Husk også at justere den falske bund i kontrolrørene tilsvarende.

Søjler, der inkuberes under total iltsvind (0% luftmætning), skal maksimalt inkubere ligeså længe, som tilfældet var for den forrige fluxmåling, hvor luftmætningen var $>0\%$.

Figur 5.1.4 Kajakrør med monteret magnet om flydelåg til brug ved ilt- og fluxmålinger. Stemplet, der monteres i bunden af plexiglasrøret, bruges til at justere sedimentoverfladens position i røret. Stemplet fastholdes i positionen ved kontraspænding, hvorved siliconepakningen presses fast mod rørets væg (gengivet med tilladelse fra KC-Denmark Research Equipment).



Figur 5.1.5 Inkubationskammer til ilt- og fluxmålinger set hhv. fra siden og fra oven. Inkubationskammeret er opdelt i 4 rum, der hver kan rumme 7 Kajak-rør. På figuren ses de gennemsigtige flydelåg, der placeres på vandoverfladen i inkubationskammeret, hvis bundvandet ved præinkubationen skal have <100% luftmætning. Under mørkeinkubationen placeres et sort låg øverst på inkubationskammeret. De små magneter i sedimentrørerne bevæges af den centralt placerede hovedomrører. Alle mål er angivet i mm (gengivet med tilladelse fra KC-Denmark Research Equipment).



5.1.6.1.2 Inkubation og prøvetagning i lys

Først inkuberes sedimentet i lys. Sedimentet skal belyses en time før ilt- og fluxmålinger startes. Hvis inkubationen foretages med flydelåg, skal så meget vand tappes af inkubationskammeret, at alle Kajak-rørerne stikker nogle få cm op over vandoverfladen, eller også løftes rørene blot en smule op over vandet. Rørerne lukkes forsigtigt, ved at placere et gennemsigtigt flydelåg i hvert rør. Inkubationen starter. Bemærk, at der ikke udtages vandprøver fra inkubationsrørene ved inkubationens start. Hvis inkubationen foretages med tætsluttende prop (dvs. med gennemsigtigt låg) kan inkubationen gennemføres under vand. Husk, at der ikke må samle sig luftbobler under lågene.

Når inkubationen er slut (inkubationslængden beregnet ved testinkubation i mørke, se 5.1.6.1.1), stoppes omrøringen, (flyde)låget fjernes, og der udtages iflg. *Anvisning 5.1.1* vandprøver fra alle rør til koncentrationsbestemmelse af ilt, orthofosfat, nitrit og nitrat samt ammonium (*Tabel 5.1.5*).

På overfladen af lyseksponerede sedimenter produceres oftest O_2 ved fotosyntese, hvilket ses i form af bobledannelse. En del af den producerede ilt undslipper på denne måde vandfasen i form af iltbobler, og

Tabel 5.1.5 Prøvetagning til ilt- og næringsstoffluxe.

sprøjte	analyse	prøve volumen	konservering	tåler opbevaring
glas	ilt	ca. 40 ml*	Winkler-I og -II	≤ 3 dage
glas- eller plast	orthofosfat	ca. 10 ml	4 M svovlsyre køleskab ved 4°C	3 mdr. eller mere
	nitrat + nitrit	ca. 10 ml	fryses straks <-18°C	
	ammonium	ca. 10 ml	fryses straks <-18°C	

* vandprøve + 2x overløb

iltproduktionen kan derfor undervurderes. For at imødegå en sådan fejlregning er det derfor nødvendigt at stoppe inkubationen inden bobledannelsen bliver for iøjnefaldende. Det betyder i praksis, at når de første iltbobler løsriver sig fra sedimentoverfladen og samler sig under (flyde)låget, afbrydes inkubationen.

Efter at alle vandprøver er udtaget, fyldes plexiglasrøret forsigtigt med vand fra inkubationskammeret, uden at sedimentet hvirvles op. Al vandet i inkubationskammeret udskiftes med så meget friskt bundvand, at sedimentrørerne kan stå under vand (som ved præinkubationen), indtil den efterfølgende mørkeinkubation starter. I denne periode fortsættes belysningen af sedimentet, indtil et slukur afbryder lyset på det tidspunkt, hvor solen går ned. Mørkeinkubationen starter den følgende dag.

Som startværdier for ilt, orthofosfat, nitrat, nitrit og ammonium bruges de koncentrationer, der måles i de tre kontrolrør, efter inkubationen er stoppet. På denne måde er der taget højde for de koncentrationsændringer, som opstår i vandsøjlen i løbet af inkubationen uden sedimentets påvirkning, fx vandsøjlenes egenrespiration, diffusion gennem plexiglasvæggen og lignende. Startværdierne angives som middelværdien af de tre kontrolrør. Beregningen af ilt- og næringsstoffluxene omtales i *afsnit 5.1.6.4*.

5.1.6.2 Inkubation og prøvetagning i mørke

De sediment, der skal inkuberes i mørke, skal præ-inkuberes (i mørke) natten over, før ilt- og fluxmålingerne startes. Ud fra testinkubationen tilpasses længden af mørkeinkubation. Fremgangsmåden ved inkubation- og prøvetagning er identisk for lys og mørkeinkubationer (*Anvisning 5.1.1 og Tabel 5.1.9*).

Anvisning 5.1.1 Prøvetagningsprocedure ved måling af ilt- og næringsstof-fluxe i lys- og mørke (dvs. prøver til koncentrationsbestemmelse af ilt, orthofosfat, nitrat, nitrit og ammonium).

Fremgangsmåde

1. Med en glassprøjte påmonteret en gastæt, gennemsigtig slange (fx Tygon®) udtages midt i vandsøjlen ca. 40 ml vandprøve til iltmåling (undgå at suge sediment med op i sprøjten).
2. Før slangen ned i bunden af en glasvial m/glaskugle (Exetainer®). Glas-set fyldes helt op, med overløb af vandprøven svarende til det dobbelte volumen, samtidig med at slangen trækkes langsomt ud. Undgå luftbobler i vandprøven. Vandprøven konserveres straks ved at tilsætte Winkler-reagens I og II som anført i *Bilag 5.1.1*: Titrimetrisk bestemmelse af opløst ilt (O₂) i vand. Prøven opbevares ved *in situ* temperatur, og iltkoncentrationen bestemmes inden for 3 dage.
3. Herefter udtages på samme måde ca. 50 ml vand til koncentrationsbestemmelse af orthofosfat, nitrat og nitrit samt ammonium. Brug en rengjort, syreskyllet, glas- eller plastiksprøjte påmonteret en diffusionstæt slange.
4. Sprøjten monteres med et glasfiberfilter (f.eks. Whatman® GF/F i Swinex-filterholder) eller celluloseacetatfilter. Lad ca. 10 ml vand skylle gennem filteret, inden det resterende vand fordeles på 4 syreskyllede reagensglas af polystyrol-, polyethylen- eller polypropylen. Orthofosfat prøven konserveres ved at tilsætte 10 µl 4 M svovlsyre pr. ml vandprøve og opbevares i køleskab ved 4°C. De øvrige tre vandprøver konserveres straks ved dybfrysning (min. -18°C).
5. Der skal ikke nødvendigvis tages tre særskilte vandprøver til nitrat og nitrit og ammonium, der kan også udtages én fælles vandprøve, som dybfryses. Ved én fælles vandprøve er det vigtigt, at alle næringsstofanalyserne udføres på vandprøven, umiddelbart efter at den er tøet op, idet vandprøven ikke kan fryses igen uden at påvirke næringsstofkoncentrationerne.

5.1.6.3 Analyser

5.1.6.3.1 Ilt

Se *Bilag 5.1.1*: Titrimetrisk bestemmelse af opløst ilt (O₂) i vand.

5.1.6.3.2 Orthofosfat

Vandprøven konserveres med 10 µl 4 M svovlsyre pr. ml og opbevares i køleskab ved 4°C. Tilsætning af svovlsyrer fører ikke til en betydende ændring af orthofosfat koncentrationen. Koncentrationsbestemmelsen af orthofosfat (PO₄³⁻) fremgår af *Bilag 5.1.2*: Fotometrisk bestemmelse af orthofosfat (PO₄³⁻) i vand.

5.1.6.3.3 Nitrat og nitrit

Vedrørende bestemmelsen af NO₃⁻ og NO₂⁻ koncentrationer er det tilstrækkeligt at indrapportere summen af de målte koncentrationer. Man skal dog være opmærksom på, at det af hensyn til analysepræcisionen oftest vil være nødvendigt at bestemme NO₃⁻ og NO₂⁻ separat.

Den gængse metode til bestemmelse af nitrit og nitrat er beskrevet i *Bilag 5.1.3: Fotometrisk bestemmelse af nitrat og nitrit i havvand*. Ved denne metode bestemmes summen af NO_3^- og NO_2^- ved at reducere nitrat til nitrit efterfulgt af måling af nitrit koncentrationen. Sumkoncentration ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) vil da udgøres af den NO_2^- , der er i prøven, og den nitrit, der dannedes ved reduktionen af nitrat. Bestemmelsen af sumkoncentrationen ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) efter ovenstående princip afhænger dog af, om reduktionen af nitrat til nitrit er 100% effektiv. Hvis dette ikke kan er tilfældet, skal effektiviteten af nitratreduktionen først bestemmes, hvorefter koncentrationen af NO_3^- og NO_2^- bestemmes separat og efterfølgende summeres.

5.1.6.3.4 Ammonium

Prøverne til bestemmelse af ammonium (NH_4^+) skal behandles meget omhyggeligt for at undgå kontamination med NH_4^+ . Brug derfor handsker og en ny pakning af reagensglas og propper hver gang et forsøg indledes. Reagensglas lukkes med prop, så snart de fjernes fra pakningen for at undgå forurening, og ammoniumprøverne eksponeres kortest muligt til luft for at minimere udvekslingen af NH_3 mellem laboratorieluft og prøve. Forskriften til ammoniumanalysen fremgår af *Bilag 5.1.4: Fotometrisk bestemmelse af ammonium (NH_4^+) i saltvand*.

5.1.6.4 Beregninger af ilt- og næringsstofkoncentrationer til brug for fluxberegning

Både efter lys- og mørkeinkubationen bestemmes koncentrationen af den kemiske forbindelse S (dvs. ilt, orthofosfat, nitrat, nitrit og ammonium) i de tre kontrol-rør og i vandfasen over hver af de 5 sedimentrør. Koncentrationen af S udtrykkes i μM .

Lys- og mørkefluxen af ilt- og næringsstofferne kan beregnes for hvert af de 5 sedimentrør ($i = 1-5$):

$$S_{\text{flux}}(i) = \frac{([S]_{t,i} - [S]_0) \times h_i}{T} \times 10$$

hvor

$S_{\text{flux}}(i)$ er lys eller mørkefluxen af S i rør i ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{time}^{-1}$)

$[S]_{t,i}$ er koncentrationen af S i vandfasen over sedimentet i rør i (μM) efter inkubationen

$[S]_0$ er gennemsnits-koncentrationen ($n = 3$) af S i kontrolrørene (μM)

T er varigheden af inkubationen, timer

h_i er højden af vandsøjlen over sedimentet i rør i (cm).

Ved denne beregning udtrykker positive værdier en produktion (dvs. fotosyntese, hvad angår ilt) eller en udadrettet flux af næringsstoffer (efflux), mens negative værdier udtrykker et forbrug af ilt (iltoptag)

eller en indadrettet flux (influx) af næringsstoffer, dvs. at sedimentet optager næringsstoffer.

For at udtrykke døgnfluxen af ilt- og næringsstofferne vægtes lys og mørkefluxene for hvert af de 5 sedimentrør

$$DS_{\text{flux},i} = [LS_{\text{flux},i} \cdot t + MS_{\text{flux},i} \cdot (24 - t)] \times 10^{-3}$$

hvor

$DS_{\text{flux},i}$ er døgnfluxen af S i rør i ($\text{mmol m}^{-2} \text{døgn}^{-1}$).

$LS_{\text{flux},i}$ og $MS_{\text{flux},i}$ er hhv. lys- og mørkefluxen af S i rør i ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{time}^{-1}$)

t er tidrummet mellem solopgang og solnedgang den pågældende dag (timer).

5.1.7 Kvalitetssikring og dataindberetning

Resultaterne af den estuarine og marine sedimentovervågning skal indberettes i STANDAT-format til Danmarks Miljøundersøgelser, Afd. for Marin Økologi. Disse data kan overføres fra *Bilag 5.1.5: Observationsskemaer*, som består af 5 skemaer. Rapporteringen skal efter hver eneste prøvetagning omfatte en skematisk beskrivelse af 1) selve prøvetagningen, 2) de kemiske forhold i vandsøjlen på prøvetagningstidspunktet, 3) en oversigt over inkubationsbetingelserne mht. temperatur, luftmætning og lys samt 4) data over de analyser, der er resultatet af sedimentundersøgelserne.

Sammen med de data, der opnås ved de egentlige sedimentanalyser, kan en grundig visuel beskrivelse af de uforstyrrede sedimentkerner være af stor betydning ved dokumentationen af variationen i sedimentets miljøtilstand, idet fysiske, kemiske og biologiske variable oftest kan ses (fx farve) eller lugtes (fx H_2S). For at kunne tolke eventuelle variationer over tid anbefales det derfor at registrere vandsøjlen fysiske tilstand på prøvetagningstidspunktet, samtidig med at de meteorologiske forhold beskrives.

5.1.7.1 Kvalitetssikring

Det overordnede formål med kvalitetskontrollen er at sikre, at:

- undersøgelsesmetoderne løbende optimeres samtidig med, at sammenligneligheden til tidligere undersøgelser sikres,
- sedimentundersøgelser og kemiske analyser gennemføres efter de metoder, der er foreskrevet i denne anvisning eller ved metoder, der er dokumenteret at være lige så gode eller bedre med hensyn til detektionsgrænser og præcision.

- sedimentundersøgelserne gennemføres i de områder og med den frekvens, der er aftalt mellem amterne og Miljøstyrelsen,
- resultaterne af feltundersøgelserne når frem til databasen og rapportererne i fejlfri form,
- der ved konstatering af egentlige fejlanalyser foretages en nyindsamling af sedimentkerner, som analyseres som erstatning for fejlanalyserne.

Derfor skal der foretages kvalitetskontrol af de forskellige delopgaver i overvågningsprogrammet:

- planlægning - på landsplan og lokalt
- feltarbejde
- laboratoriearbejde
- databehandling - på landsplan og lokalt
- dataoverførsel
- rapportering - på landsplan og lokalt

Det er vigtigt, at der for hver delopgave er en person, som er hovedansvarlig for, at delopgaven løses korrekt. Kvaliteten af den enkelte delopgave skal først kontrolleres gennem en egenkontrol og dernæst kontrolleres af personale, der ikke har været direkte involveret i den pågældende delopgave.

De indsamlede data kvalitetssikres bl.a. ved:

- præcise anvisninger til indsamling, behandling og inkubation af sedimentprøver (*afsnit 5.1.3 og 5.1.5*)
- præcise anvisninger til bestemmelse af ilt- og næringsstoffluxe (*afsnit 5.1.6*)
- præcise metodebeskrivelser til koncentrationsbestemmelse af ilt (*Bilag 5.1.1*), orthofosfat (*Bilag 5.1.2*), nitrit og nitrat (*Bilag 5.1.3*) og ammonium (*Bilag 5.1.4*).
- at afholde workshop med fokus på praktiske aspekter i forbindelse med sedimentprøvetagningsprogrammet i det omfang det skønnes nødvendigt (arrangeres af Danmarks Miljøundersøgelser, Afd. for Marin Økologi)
- at interkalibrere koncentrationsmålinger af ilt, orthofosfat, nitrit og nitrat samt ammonium.

Kvaliteten af overvågningsprocessen højnes yderligere, hvis hele processen fra prøvetagningen, observation af sedimentet til analyse, da-

taberegning og rapportering udføres hurtigt og fordeles på så få personer som muligt.

5.1.7.2 Observationer og indberetning af A- og B-data

I forbindelse med indsamlingen af sedimentkerner, inkubation og analyser er der

1. data der skal indberettes i STANDAT-format til Danmarks Miljøundersøgelser, Afd. for Marin Økologi. Disse data benævnes A-data.
2. data der kan indberettes i STANDAT-format til Danmarks Miljøundersøgelser, Afd. for Marin Økologi, men i NOVANA ikke er påkrævede. Disse data benævnes B-data.

I øvrigt henvises til Det Marine Fagdatacenters hjemmeside: Vejledning til indrapportering (sedimentovervågning) for en STANDAT-oversigt over A- og B-data.

Er det et ønske at beskrive sedimentet i forbindelse med prøvetagningen, skal dette gøres kortest mulig tid efter indsamlingen (i felten!) ud fra det samlede visuelle indtryk, der fås ved at betragte alle de kerner, der skal hjembringes til laboratoriet. I de tilfælde, hvor det ikke er muligt at indsamle uforstyrrede sedimentkerner, skal disse stå så længe det tager sedimentet at bundfældes, så overfladesedimentet kan ses og beskrives gennem den klare vandsøjle.

Nedenfor kommenteres de 5 sider i Observationsskemaet (*Bilag 5.1.5*).

5.1.7.2.1 Side 1 - Station og generelle oplysninger i forbindelse med prøvetagningen

A-data: Institution, stationsnummer, længdegrad, breddegrad, vanddybde, dato, tidspunkt (dvs. starttid: timer og starttid: ,minutter), lysintensitet (overflade og bund), temperatur (overflade og bund), salinitet (overflade og bund), lysdæmpning (i % ^v/bund), iltkoncentration (overflade og bund), analyselaboratorium, dato og metode.

"**Station**" indeholder oplysninger om navn på den prøvetagende institution (sædvanligvis amt), stationsnummer, lokalitet, position (anført i WGS 84) og officielle vanddybde.

For at kunne sammenholde oplysningerne i rapporten (i tilfælde af at siderne adskilles) overføres oplysninger om institution og stationsnummer, samt dato for selve prøvetagningen til rapportens øvrige 6 sider.

"**Generelle oplysninger i forbindelse med prøvetagningen**" indeholder oplysninger vedr. stationsdata, indsamling af sediment og bundvand samt resultatet af de vandkemiske analyser.

Stationsdata: her anføres dato og klokkeslæt (GMT) når prøvetagningen starter, den aktuelle position samt (institutions)navn på obser-

vatør. Endvidere anføres oplysninger om vejret (herunder vindstyrke, vindretning og skydække) samt vandet: aktuelle vanddybde, bølgehøjde, Secchi-dybde, og lysintensitet ved vandoverflade og bund.

Indsamling af sediment og bundvand: her anføres (institutions)navn på prøvetager og ved afkrydsning angives brug af prøvetagningsudstyr.

Forstyrrelse ved prøvetagningen: Sedimentkerner skal indsamles så uforstyrrede som muligt, om nødvendigt ved gentagen prøvetagning. Sediment, der kan indsamles uden, at det hvirvles op i vandfasen, betegnes ved 00: ingen forstyrrelse. Er sedimentet trods alt blevet forstyrret ved prøvetagningen, noteres 10: lidt forstyrret, hvis vandfasen indeholder en del sedimentpartikler, men dog er delvis klar, mens 20 udtrykker et meget forstyrret sediment (dvs. vandfasen er uklar). HUSK AT sedimentkerner, hvor vandfasen indeholder store mængder af sediment, eller hvor sedimentet indeholder større sten, skaller, dyr og lignende, ikke kan bruges og derfor skal kasseres. Disse sedimentkerner medtages ikke ved vurderingen af, i hvor høj grad de indsamlede kerner, der benyttes ved sedimentanalyserne, blev forstyrret ved prøvetagningen.

Bundvandet skal, så vidt det overhovedet er muligt, indsamles så man undgår sediment i vandet - om nødvendigt ved gentagen prøvetagning. Bundvand uden sediment betegnes ved 00: ingen sediment i bundvandet, mens 10 anføres ved lidt sediment i vandfasen og 20 ved meget sediment (dvs. vandfasen er næsten ugennemsigtig). HUSK at lade sedimentet i bundvandet sedimentere før vandet overføres til inkubationskammeret. Vandet må ikke filtreres!

Vandkemiske analyser: Til brug for (præ)inkubation af de indsamlede sedimentkerner anføres her temperatur, salinitet, iltindhold (i mg O₂ liter⁻¹ eller µM) og bundvandets luftmætning.

5.1.7.2.2 Side 2 - Beskrivelse af sedimentoverfladen

A-data: ingen.

På denne side beskrives de visuelle observationer, der gøres af sedimentoverfladen. Denne beskrivelse kan foretages, mens sedimentet endnu opholder sig i fx HAPSen, eller efter at det er indsamlet i det gennemsigtige plexiglasrør. Ikke al prøvetagning af sediment foretages af dykker, og derfor skal sedimentoverfladen først beskrives, efter at det er indsamlet - udseendet af sedimentoverfladen skal altså ikke beskrives af dykkeren *in situ*.

Overflade: her anføres, hvem der er observationsansvarlig (vha. initialer) og fra hvilken *institution*.

Tidspunkt for observationen: noteres, idet der kan ske væsentlige forandringer i de mere reducerede sedimentsøjler, hvis de henstår mere end 1 time efter optagning af sedimentet.

farve: anføres ved X for mest dominerende farveindtryk (højst X i 2 felter).

struktur: anføres ved X for mest dominerende indtryk (højst X i 2 felter).

tekstur: anføres ved X (kun X i ét felt).

største mineral partikel: angives i mm.

Sedimentbelægning: her anføres ved X, om der observeres diatoméer, blå-grønne alger eller *Beggiatoa* på sedimentoverfladen og deres dækningsgrad noteres. Diatoméer og blågrønne alger ses ofte på overfladen af lyspåvirket sediment, mens *Beggiatoa* kan observeres på sedimentoverfladen som hvide belægninger efter længere tids iltsvind.

Sedimentmakrofauna: her anføres ved X, hvilke typer af makrofauna der observeres på sedimentoverfladen samt dækningsgrad.

5.1.7.2.3 Side 3 - Sedimentzonering

A-data: ingen.

De indsamlede sedimentkerner beskrives fra sedimentoverfladen ned til 10 cm dybde, efter at de er indsamlet i gennemsigtige plexiglasrør. I hovedtræk beskrives samme parametre som på sedimentoverfladen (se 5.1.9.2.2). I indberetningsskemaet markeres med en lodret streg dybdeudbredelsen af den pågældende parameter. Disse observationer overføres senere til STANDAT-format, og derfor anføres i hver dybde kun den mest dominerende parameter inden for hver gruppe: farve, struktur, tekstur, lejrning og biologi.

farve: viser især de forskellige jernforbindelsers fordeling.

struktur: et sammenhængende sediment kan skubbes mindst 1 cm ud af plexiglasrøret, mens et flydende sediment vil løbe ned langs siderne af røret, når det forsøges skubbet ud.

tekstur og lejrning: disse observationer vil afspejle udviklingen i sedimentationsforholdene og indikere, om forholdene hidtil har været konstante. Ved en løbende sedimentbeskrivelse foretages en hurtig omend grov registrering af eventuelle forandringer i sedimentationsforholdene. Synlig lagdeling viser varierende sedimentation uden bioturbation og/eller resuspension af betydning. Skrålejrning kan skyldes bølgeribber eller pålejringer omkring lokale lægivere eller sedimenttilstrømninger. Gradvise overgange kan skyldes bioturbation, mens mere bratte overgange kan opstå ved resuspension.

biologi: heterogenitet i sedimentets farve og strukturer skyldes ofte nylige oprodninger af sedimentet ved faunaens graveaktivitet. I så fald angives udbredelsen af denne oprodning. Ligeledes kan åbne gange fra ventilerende dyr ofte observeres. Horisonter med skaller af muslinger og andre dyr kan ved sammenligning med den aktuelle levende fauna give et fingerpeg om faunaændringer gennem længere tid. *Beggiatoa* forekommer normalt kun på grænsen mellem iltholdigt og svovlbrinteholdigt sediment - kan være vanskelig at se i sedimentet. Observeres oftest (under iltsvind) på sedimentoverfladen.

5.1.7.2.4 Side 4 og 5 - Ilt- og næringsstofffluxe (1) og (2)

A-data (side 4): Alle data på denne side bortset fra "analytiker".

Side 4: Her anføres, hvem der er ansvarlig udførelsen af fluxinkubationerne (*Analyselaboratorium*) og ved hvilke inkubationsbetingelser fluxmålingerne er udført: luftmætning, temperatur, lys/ mørke samt anvendt lysintensitet ved sedimentoverfladen. Dato for fluxinkubationen og initialer for ansvarlige person noteres.

Endvidere rapporteres analyseansvarlige for de enkelte analyser, dvs. analyselaboratorium, analytiker (vha. initialer) og dato for analysens udførelse (tjener til identifikation af det enkelte analyseresultat) samt analysemetode.

A-data (side 5): Alle data på denne side.

Side 5: Her skrives resultatet af analyserne.

5.1.8 Referencer

Canfield, D.E., Jørgensen, B.B., Fossing, H., Glud, R., Gundersen, J., Ramsing, N.B., Thamdrup, B., Hansen, J.W., Nielsen, L.P. & Hall, P.O.J 1993: Pathways of organic carbon in three continental margin sediments. – *Marine Geology* 113, 27-40.

Christensen, P.B, Dalsgaard, T., Fossing, H., Rysgaard, S. & Sloth, N. 2002: Stofomsætning i havbunden. Danmarks Miljøundersøgelser. – TEMA-rapport fra DMU 42/2002: 62 s.

Christensen, P.B. (Ed.), Møhlenberg, F., Krause-Jensen, D., Jensen, H.S., Clausen, P., Sortkjær, O., Schlüter, L., Josefsen, S.B., Jørgensen, C., Andersen, F.Ø., Thomassen, J., Thomsen, M.S. & Nielsen, L.P. 1994: Stoftransport og stofomsætning i Kertinge Nor/Kerteminde Fjord. – *Havforskning fra Miljøstyrelsen*, 43.

Christensen, P.B. (Ed.), Møhlenberg, F., Lund-Hansen, L.C., Borum, J., Christiansen, C., Larsen, S.E., Hansen, M.E., Andersen, J. & Kirkegaard, J. 1996: Havmiljøet under forandring? – *Havforskning fra Miljøstyrelsen*, 61.

Fossing, H., Berg, P., Thamdrup, B., Rysgaard, S., Munk Sørensen, H. & Nielsen, K. 2002: Ilt- og næringsstoffluxmodel for Århus Bugt og Mariager Fjord. Modelopsætning. Danmarks Miljøundersøgelser. – Faglig rapport fra DMU 416: 72 s.

Fossing, H., Thamdrup, B. & Jørgensen, B.B. 1992: Havbundens svovl-, jern- og mangankredsløb i Århus Bugt. – *Havforskning fra Miljøstyrelsen*, 15.

Gundersen, J.K., Glud, R.N. & Jørgensen, B.B. 1995: Havbundens iltomsætning. – *Havforskning fra Miljøstyrelsen*, 57.

Hansen, J.W., Thamdrup, B., Fossing, H. & Jørgensen, B.B. 1994: Redoxbalancen og mineraliseringens temperaturafhængighed i Århus Bugt. – Havforskning fra Miljøstyrelsen, 36.

Howarth, R.W. & Jørgensen, B.B. 1984: Formation of ^{35}S -labeled elemental sulfur and pyrite in coastal marine sediments (Limfjorden and Kysing Fjord, Denmark) during short term $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ reduction measurements. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48, 1807-1818.

Iversen, N. & Jørgensen, B.B. 1985: Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). – *Limnology and Oceanography* 30, 944-955.

Jørgensen, B.B. 1982: Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction. – *Nature* 296, 643-645.

Jørgensen, B.B. (Ed.) 1995: Stoftransport og stofomsætning i Århus Bugt. – Havforskning fra Miljøstyrelsen, 59.

Jørgensen, B.B. & Revsbech 1989: Oxygen uptake, bacterial distribution, and carbon-nitrogen-sulfur cycling in the sediments from the Baltic Sea - North Sea transition. – *Ophelia* 31, 29-49.

Lomstein, B.Aa & Blackburn, T.H. 1992: Havbundens kvælstofomsætning i Århus Bugt. – Havforskning fra Miljøstyrelsen, 16.

Mortensen, P.B., Jensen, H.S., Rasmussen, E.K. & Andersen, F.Ø. 1992: Fosforomsætning i sedimentet i Århus Bugt. – Havforskning fra Miljøstyrelsen, 17.

Nielsen, L.P., Christensen, P.B. & Rysgaard, S. 1994: Denitrifikation i fjorde og kystnære farvande. – Havforskning fra Miljøstyrelsen, 50.

Nielsen, L.P., Jensen, M.H., Andersen, P. & Rasmussen, B. 1990: Overvågning af sedimenter i Limfjorden; redegørelse om sedimentomsætningen og forslag til metoder. Limfjordskomiteen.

Sørensen, J. & Jørgensen, B.B. 1987: Early diagenesis in sediments from Danish coastal waters: Microbial activity and Mn-Fe-S geochemistry. – *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51, 1583-5129.

Thode-Andersen, S. & Jørgensen, B.B. 1989: Sulfate reduction and the formation of ^{35}S -labelled FeS, FeS₂ and S⁰, in coastal marine sediments. – *Limnology and Oceanography* 34, 793-806.

Ærtebjerg, G., Andersen, J.H. & Hansen, O.S. (Eds.) 2003: Nutrients and Eutrophication in Danish Marine Waters. A Challenge for Science and Management. National Environmental Research Institute. 126 pp.

Bilag 5.1.1

Titrimetrisk bestemmelse af opløst ilt (O₂) i vand (Winkler titrering)

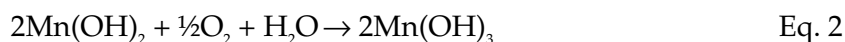
Analysen er, bortset fra reduktion af prøvevolumen, identisk med Dansk Standard DS 277.

1.1 Princip

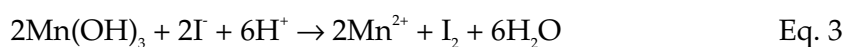
Når Winkler I og Winkler II (fældningsreagenserne) tilsættes vandprøven, dannes en hvid udfældning af mangan(II)hydroxyd:



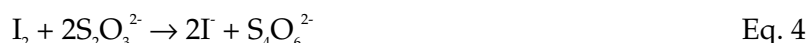
Iltet i vandprøven vil hurtigt og kvantitativt oxidere det dannede mangan(II)hydroxyd til brun mangan(III)hydroxyd:



Når prøven forsures med fosforsyre, opløses udfældningerne, og Mn³⁺-ionerne oxiderer iodid (tilsat sammen med Winkler II reagenset) til jod:



Det dannede jod oxiderer thiosulfat til tetrathionat:



Ved thiosulfat-titreringen forbruger 1 mol O₂ således 4 mol S₂O₃²⁻.

Iltkoncentrationen angives i µM og omregnes til mg O₂/ liter ved multiplikation med 0,032.

1.2 Reagenser

Til fremstilling af reagenser, fortyndinger samt skylning af glasvarer og apparatur skal anvendes destilleret eller rensset demineraliseret vand. f.eks. fra MILLI-Q eller Elgastat Maxima anlæg.

Alle reagenser skal være af analysekvalitet.

Winkler I reagens: Opløs 480 g mangan(II)sulfat, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, i 1 liter vand. Filtrér opløsningen hvis den er uklær.

Winkler II reagens: Opløs under omrøring i små portioner 320 g natriumhydroxyd, NaOH , i ca. 500 ml vand. Afkøl lidt og opløs under fortsat omrøring 600 g natriumiodid, NaI , i den basiske opløsning. Fortynd til 1 liter. Dekanter opløsningen forsigtigt hvis der dannes bundfald. Opbevar opløsningen i polyethylenflaske.

85% fosforsyre: Koncentreret fosforsyre, H_3PO_4 (densitet = 1,71 g/ml).

Thiosulfat-opløsning, 10,0 mM: Fremstilles ved at fortynde 0,1 M $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (Titrisol®, Merck) 10x med vand.

Stivelsesopløsning, 1%: 1 g stivelse opløses i 100 ml vand under langsom opvarmning ($<90^\circ\text{C}$). Ved stuetemperatur konserveres stivelsesopløsningen med 0,1 g salicylsyre, 2-(OH) $\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}$.

1.3 Koncentrationsbestemmelse

1.3.1 Prøveudtagning og opbevaring

Afhængig af vandprøvens volumen anvendes flasker med forskellig størrelse: a) 100 ml Winkler-flaske, b) 50 ml Winkler-flaske eller c) 12 ml glas vial m/glaskugle (Exetainer®, Labco, High Wycombe, UK). Det nøjagtige volumen bestemmes ud fra vægten af vandprøven.

1. Overfør vandprøven til Winkler-flasken gennem en gennemsigtig diffusionstæt slange (fx Tygon®). Ved små vandprøver udtages prøven først med glassprøjte og overføres derefter til glas vialen gennem slangen. Undgå luftbobler i vandprøven.
2. Før slangen ned i bunden af flasken, og overfør vandprøven med overløb svarende til det dobbelte af flaskens volumen. Fyld flasken helt op, samtidig med at slangen trækkes langsomt ud.
3. Tilsæt - nogle få cm under overfladen - Winkler I reagens efterfulgt af Winkler II reagens svarende til ca. 1% af flaskens volumen for hver af reagenserne, dvs., a) 1 ml + 1 ml, b) ½ ml + ½ ml, c) 120 µl + 120 µl.
4. Luk flasken uden at fange luftbobler under proppen.
5. Bland reagenserne ved hurtigt at vende flasken et par gange.

6. Prøven anbringes mørkt ved vandprøvens *in situ* temperatur. Ved temperaturfald kan der suges luft ind i Winkler-flasken/ved temperaturstigning presses vand ud af flasken.

Gennemfør thiosulfat-titreringen indenfor 3 dage.

1.3.2 Thiosulfat-titrering af den konserverede prøve

1. Udfældningen skal have sedimenteret så mindst 2/3 af prøveopløsningen er klar.
2. Tilsæt (uden at opblande bundfaldet) fosforsyre svarende til ca. 2% af Winklerflaskens volumen, dvs., a) 2 ml, b) 1 ml, c) 240 µl.
3. Luk Winkler-flasken uden at fange luftbobler i flasken og ryst flasken til alt bundfaldet er opløst.
4. Udtag en delprøve (5,00 ml) til titrering.
5. Under omrøring titreres med 10,0 mM thiosulfat indtil den gule farve er næsten forsvundet. Herefter tilsættes en dråbe stivelsesopløsning. Opløsningen farves violet.
6. Titreringen med thiosulfat fortsættes, indtil den violette farve forsvinder første gang. Volumen af $S_2O_3^{2-}$ noteres.

Iltkoncentrationen, $[O_2]$ µM, i vandprøven beregnes ved følgende generelle formel:

$$[O_2] = \frac{a \times [S_2O_3^{2-}] \times V}{4 \times V_T (V - V_R)} - \frac{R(O_2) \times V_R}{V - V_R} \quad (A)$$

hvor

a er forbruget af $S_2O_3^{2-}$ ved titrationen (ml),

$[S_2O_3^{2-}]$ er koncentrationen af thiosulfatet (µM),

V er volumen af Winkler-flasken (ml),

V_T er volumen af den titrerede delprøve (ml),

V_R er det totale volumen (ml) af de tilsatte fældningsreagenser (Winkler I + Winkler II)

$R(O_2)$ er "den fælles O_2 -koncentrationen" (µM) af fældningsreagenserne - bestemmes som beskrevet nedfor.

Bemærk også den forenkede beregningsformel (A*) nedenfor (1.3.3).

1.3.3 Bestemmelse af O₂ koncentration, R(O₂), i fældningsreagenserne

1. Tre 100 ml Winkler-flasker fyldes med luftmættet vand (ferskvand (vandhanevand) eller saltvand). Vær meget omhyggelig med at, O₂-indholdet i alle tre Winkler-flasker er identisk.
2. Tilsæt til de tre Winkler-flasker - nogle få cm under overfladen - hhv. 1,0 ml, 2,0 ml og 3,0 ml Winkler I reagens og 1,0 ml, 2,0 ml og 3,0 ml Winkler II reagens.
3. Luk Winkler-flasken uden at fange luftbobler i flasken.
4. Bland reagenserne ved hurtigt at vende flasken et par gange.
5. Prøven anbringes mørkt ved vandprøvens *in situ* temperatur.
6. Når manganhydroxydudfældningerne er sedimenteret så mindst 2/3 af prøveopløsningen er klar, tilsættes hhv. 2 ml, 4 ml, og 6 ml fosforsyre til de tre Winkler-flasker (uden at opblende bundfaldet).
7. Følg derefter anvisningen 1.3.2: *Thiosulfat-titrering af den konserverede prøve.*

Den tilsyneladende O₂ koncentration i vandprøven beregnes og udtrykkes som en funktion af V_R, dvs.,

$$[\text{O}_2]_{\text{tilsyneladende}} = \frac{a \times [\text{S}_2\text{O}_3^{2-}] \times V}{4 \times V_T (V - V_R)} = \alpha \times V_R + \beta$$

hvor

β er vandprøvens reelle O₂ koncentration (μM),

α er korrektionen for ilt overført til vandprøven med fældningsreagenserne ($\mu\text{M}/\text{ml}$),

V_R er det totale volumen (ml) af de tilsatte reagenser (Winkler I + Winkler II).

Idet β kan udtrykkes ved ligning (A) fås

$$R(\text{O}_2) = \alpha \times (V - V_R)$$

Sædvanligvis er det sammenlagte indhold af O₂ i fældningsreagenserne af størrelsesordenen 46 μM . Det betyder, at hvis 1) blandingsforholdet mellem vandprøve og fældningsreagenserne er 98:2, 2) der anvendes 10 mM thiosulfat til titreringen og 3) der titreres 5 ml fældet prøve, kan vandprøvens iltkoncentration (μM) udtrykkes ved

$$[\text{O}_2] = 510,20 \times a - 0,94 \quad (\text{A}^*)$$

hvor

a er forbruget (ml) af 10 mM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ved titrationen.

1.4 Interferens

Ingen.

1.5 Referencer

Dansk Standard DS 277, December 1974: Titrimetrisk bestemmelse af opløst oxygen i vand. 1.udg. 6 s.

Grasshoff, K. 1983: Determination of oxygen. In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M. og Kremling, K. Methods of Seawater Analysis. Verlag Chemie, Weinheim, 61-72.

Bilag 5.1.2

Fotometrisk bestemmelse af orthofosfat (PO_4^{3-}) i vand

Væsentligste afvigelser fra Dansk Standard DS 291:

- prøvevolumen er reduceret fra 25 ml til 2,5 ml,
- i stedet for vand som referenceopløsning ved absorptionsmålingen anvendes en opløsning bestående af fosfat-frit kunstigt havvand (behandlet på samme måde som prøven og med samme salinitet $\pm 5\%$).

2.1 Princip

I svovlsur opløsning (ca. 0,2 M) danner orthofosfat med molybdat og antimon(III), antimon-12-fosformolybdensyre, som reduceres med ascorbinsyre til et heteropolykompleks (molybdenblåt). Kompleksets absorptions ved 880 nm (eller eventuelt ved 700 nm) er proportionalt med orthofosfat-indholdet.

Ortho-fosfat koncentrationen angives i μM og omregnes til $\mu\text{g P/liter}$ ved multiplikation med 30,97. Metoden kan anvendes direkte inden for standardkurvens lineære område op til ca. 25 μM .

2.2 Reagenser

Til fremstilling af reagenser, fortyndinger samt skylning af glasvarer og apparatur skal anvendes destilleret eller rensede demineraliseret vand, f.eks. fra MILLI-Q eller Elgastat Maxima anlæg. Om nødvendigt skal vandets og reagensernes fosforindhold kontrolleres som beskrevet neden for.

Alle reagenser skal være af analysekvalitet.

Rengør udstyret med varm 2 M saltsyre eller lad det ligge i syren i ét døgn og skyl grundigt med vand. Kolber som anvendes ved farverreaktionen skal desuden skylles med natriumhydroxid-opløsning for at fjerne molybdenblåt, der kan være adsorberet på væggene. Skyl derefter grundigt med vand. Beskyt udstyret mod støv og skyl påny før anvendelse. Udstyret bør ikke anvendes til andre analyser. *Fosforholdige rengøringsmidler må ikke anvendes.*

Anvend flasker af borsilicat eller polyethylen. En grundig rengøring af flaskerne er nødvendig, da fosfor let adsorberes på væggene.

Filtre skal ligge i vand mindst et døgn før anvendelsen. De skal opbevares i vand, som skal skiftes hver dag.

Svovlsyre, 4 M: Tilsæt forsigtigt og under omrøring 110 ml koncentreret svovlsyre, H_2SO_4 (densitet = 1,84 g/ml), til ca. 350 ml vand. Afkøl til stuetemperatur og fortynd til 500 ml.

Svovlsyre, 40 mM: Fortynd 10 ml 4 M svovlsyre til 1 liter med vand.

Saltsyre, ca. 2 M: Tilsæt 160 ml koncentreret saltsyre, HCl (densitet = 1,19 g/ml), til 840 ml vand. Anvendes til rengøring.

Natriumhydroxid-opløsning, ca. 4 M: Opløs 160 g natriumhydroxid, NaOH, i ca. 800 ml vand under omrøring og køling og fortynd til 1 liter. Anvendes til rengøring.

Ascorbinsyre-opløsning, 50 g/l: Opløs 5 g ascorbinsyre, $C_6H_8O_6$, i 100 ml vand. Opbevar opløsningen i en mørk flaske i køleskab (4°C). Opløsningen er da holdbar i flere uger og kan anvendes, så længe den er farveløs.

Molybdat-reagens: Fremstilles af følgende opløsninger:

Svovlsyre: Tilsæt i et 600 ml bægerglas forsigtigt og under omrøring 120 ml koncentreret svovlsyre, H_2SO_4 (densitet = 1,84 g/ml), til 170 ml vand. Afkøl til stuetemperatur.

Molybdat-opløsning: Opløs 13 g ammoniumheptamolybdat, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ i 100 ml vand.

Antimon-opløsning: Opløs 0,35 g kaliumantimon(III)oxidtartrat, $K(SbO)C_4H_4O_6$, i 100 ml vand.

Fremstil molybdat-reagenset ved under omrøring først at tilsætte molybdat-opløsningen og derefter antimon-opløsningen til svovlsyren. Bland grundigt og hæld opløsningen i en 500 ml målekolbe og fortynd til mærket. Opbevar opløsningen i en mørk glasflaske af resistent glas. Opløsningen er holdbar i mindst to måneder.

Kunstigt havvand, 100‰: Opløs 89,3 g natriumchlorid, NaCl, 28,6 g magnesiumsulfat heptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, og 0,13 g natriumhydrogencarbonat, $NaHCO_3$, i 800 ml vand og fortynd til 1000 ml. Opløsningen opbevares i køleskab og er holdbar i ca. 1 måned.

Kunstigt havvand, x‰: Fortynd (10x) ml 100‰ kunstigt havvand med vand til 1 liter.

Svovlsurt kunstigt havvand, x‰: Tilsæt 10 µl 4 M svovlsyre per ml x‰ kunstigt havvand. Bruges til fortynding.

Fosfat-stamopløsning, 2,0 mM: Tør kaliumdihydrogenfosfat, KH_2PO_4 , i 1 time ved 105 °C. Opløs 0,273 g i vand i en 1000 ml målekolbe, tilsæt 10 ml 4 M H_2SO_4 og fortynd til mærket. Opbevar opløsningen i en glasflaske i køleskab (4°C). Opløsningen er holdbar i mindst tre måneder.

Fosfat-standardopløsning, 40 μM : Overfør 10,0 ml 2,0 mM fosfat-stamopløsning til en 500 ml målekolbe og fortynd til mærket med kunstigt havvand af samme saltholdighed som prøven $\pm 5\%$. Opløsningen skal fremstilles samme dag, som den skal anvendes.

2.3 Koncentrationsbestemmelse af PO_4^{3-} - absorptionsmåling

2.3.1 Bestemmelse af farve-reagensets absorptionskoefficient, PO_4^{3-} -standardkurve

1. Overfør 0 μl , 250 μl , 500 μl , 1250 μl , 2500 μl , 5000 μl , 10000 μl og 15000 μl af fosfat-standardopløsningen (40 μM PO_4^{3-}) til 25 ml målekolbe og fortynd prøverne til 25 ml med kunstigt havvand af samme saltholdighed som prøven $\pm 5\%$. Herved fås flg. PO_4^{3-} koncentrationer: 0,0 μM (dvs., blank-prøven), 0,4 μM , 0,8 μM , 2,0 μM , 4,0 μM , 8,0 μM , 16,0 μM og 24,0 μM .
2. Tilsæt 250 μl 4M svovlsyre og bland.
3. 2,5 ml af den forsurede standard-opløsningen overføres til reagensglas.
4. Tilsæt 100 μl ascorbinsyre-opløsning, bland og vent 30 sek.
5. Tilsæt 100 μl molybdat-reagens og bland igen.
6. Mellem 10 til 30 minutter efter sidste reagenstilsætning måles opløsningens absorptions ved 880 nm i 1 cm kuvette, efter at spektrofotometeret er nulstillet ved brug af blank-prøven.

Ud fra hældningen af standardkurven beregnes molybdat-reagensets absorptionskoefficient, α , μM per abs. enhed. Kontrollér kalibreringskurven regelmæssigt.

2.3.2 Bestemmelse af PO_4^{3-} koncentration i vandige prøver

1. Den konserverede prøve rystes omhyggeligt og 2,5 ml af den forsurede, homogene vandprøve (10 μl 4 M svovlsyre/ ml prøve) overføres til reagensglas. Eventuel fortynding foretages med svovlsur kunstigt havvand af samme saltholdighed som prøven $\pm 5\%$.
2. Tilsæt 100 μl ascorbinsyreopløsning, bland og vent 30 sek.
3. Tilsæt 100 μl molybdat-reagensopløsning og bland igen.
4. Mellem 10 til 30 minutter efter sidste reagenstilsætning måles opløsningens absorptions, A , ved 880 nm i 1 cm kuvette, efter at spektrofotometeret er nulstillet ved brug af en blank-prøve bestående af fosfat-frit kunstigt havvand (behandlet på samme måde som vandprøven og med samme salinitet $\pm 5\%$).

Koncentrationen af PO_4^{3-} (μM) i den målte prøve beregnes ved:

$$[\text{PO}_4^{3-}] = \alpha \times (A - A_b) \times F$$

hvor

α er molybdat-reagensopløsningens absorptionskoefficient, μM pr. abs. enhed, ved den aktuelle salinitet,

A er absorbansen målt med blank-prøven som referenceopløsning

A_b er absorbansen af blind-prøven målt med blank-prøven som referenceopløsning (se nedenfor)

F er fortyndingen af prøven.

2.3.3 Interferens fra farvede prøver: blind-prøve

Hvis prøvens turbiditet eller farve er så stærk, at den kan tænkes at bidrage til absorbansen, udføres en blindprøve:

1. 2,5 ml af prøven overføres til reagensglas. Husk evt. at fortynde.
2. Tilsæt 100 μl ascorbinsyreopløsning, bland og vent 30 sek.
3. Tilsæt 100 μl 40 mM svovlsyre (til erstatning for molybdat-reagenset) og bland igen.
4. Mellem 10 til 30 minutter efter sidste reagenstilsætning måles blindprøveopløsningens absorbans, A_b , ved 880 nm i 1 cm kuvette efter at spektrofotometeret er nul-stillet ved brug af en blank-prøve bestående af fosfat-frit kunstigt havvand (behandlet på samme måde som vandprøven og med samme salinitet $\pm 5\%$).

2.3.4 Bestemmelse af PO_4^{3-} koncentration i reagenserne

Fremstil følgende to opløsninger:

Opløsning 1 (blank-prøven): Bland 2,5 ml 40 mM svovlsyre, 100 μl ascorbinsyre og efter 30 sek. 100 μl molybdat-reagensopløsning.

Opløsning 2: Bland 2,3 ml 40 mM svovlsyre, 200 μl ascorbinsyre og efter 30 sek. 200 μl molybdat-reagensopløsning.

Mål som angivet ovenfor opløsning 1's absorbans (A_1) og opløsning 2's absorbans (A_2) med vand som referenceopløsning.

Beregn følgende værdier:

$$A_r = A_2 - A_1$$

$$A_v = A_1 - A_r = 2A_1 - A_2$$

hvor det tilnærmelsesvis gælder, at:

A_r er absorbansbidrag fra farvefremkaldende reagenser,

A_v er absorbansbidrag fra vand og svovlsyre.

2.4 Interferens

Arsenat (AsO_4^{3-}) reagerer med molybdat-reagensopløsningen på samme måde som PO_4^{3-} , hvilket resulterer i en lignende farve. Havvands naturlige AsO_4^{3-} -indhold på 10-30 nM interfererer ikke med fosfatmålingen. Ved højere koncentrationer forhindres arsenat reaktionen ved reduktion til arsenit (se DS 291: 5.5.1)

Nitrit (NO_2^-) interfererer ved koncentrationer $>20 \mu\text{M NO}_2^-$. Interferensen kan forhindres ved tilsætning af sulfamidysyre (se DS 291: 5.5.3)

Svovlbrinte (H_2S) interfererer ved koncentrationer $>60 \mu\text{M H}_2\text{S}$, men kan fjernes ved at gennemboble den konserverede, sure prøve med N_2 .

Silicium(Si) danner også et blåfarvet kompleks med molybdat. Under de givne reaktionsbetingelser sker farvedannelsen så langsomt, at indhold under $180 \mu\text{M Si}$ (5 mg Si/ liter) ikke interfererer.

2.5 Referencer

Dansk Standard DS 291, Marts 1995: Vandundersøgelse. Orthophosphat-phosphor. Fotometrisk metode. 2. udg. pp. 11.

Koroleff, F., 1983: Determination of phosphorus. In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M. og Kremling, K. Methods of Seawater Analysis. Verlag Chemie, Weinheim, 125-139.

Bilag 5.1.3

Fotometrisk bestemmelse af nitrit (NO₂⁻) og nitrat (NO₃⁻) i saltvand

Afviger på flere punkter fra Dansk Standard DS223, bl.a.

- prøvevolumen er reduceret til 200 µl,
- reduktor volumen reduceret til ca. 300 µl ≈ 100 mm x 2 mm (ID),
- reduktor består af kobberbelagt cadmium,
- absorbansen måles ved 540 nm,
- reduktion af nitrat og tilsætning af farvereagens foretages med Flow Injection Analysator får at opnå præcis eluerings- og elueringstid af det lille prøvevolumen gennem cadmiumsøjlen.

3.1 Princip

Nitrat reduceres af kobberbelagt cadmium til nitrit med et udbytte på mindst 90 %. Reduktionen sker i en imidasol buffer-opløsning ved pH = 8,0 - 8,5.

Nitrit reagerer i sur opløsning (pH = 1,5 - 2) med sulfanilamid, hvorved der dannes en diazo-forbindelse, som videre kobles til N-(1-naphtyl)-etylendiamin og danner et azo-farvestof. Farvens intensitet er proportional med nitritkoncentrationen. Absorbansen måles ved 540 nm.

Nitrit- og nitrat-koncentrationen angives i µM. Omregnes til µg N/l ved multiplikation med 14,01.

Metoden kan anvendes direkte indenfor standardkurvens lineære område (se 5.3.1)

3.2 Reagenser

Til fremstilling af reagenser, fortyndinger samt skylning af glasvarer og apparatur skal anvendes destilleret eller rensat demineraliseret vand. f.eks. fra MILLI-Q eller Elgastat Maxima anlæg. Om nødvendigt skal vandets nitrit-, NO₂⁻, og nitrat-indhold, NO₃⁻, kontrolleres.

Alle reagenser skal være af analysekvalitet.

Saltsyre, 3 M: Tilsæt 248 ml koncentreret saltsyre, HCl (densitet = 1,19 g/ml), til ca. 800 ml vand og fortynd til 1 liter.

Saltsyre, 0,5 M: Fortynd 167 ml 3 M saltsyre, HCl, med vand til 1 liter.

Kobbersulfat-opløsning, 1 mM: Opløs 0,249 g kobbersulfat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i ca. 500 ml vand og fortynd til 1 liter.

Kobbersulfat-opløsning, 1% w/v: Opløs 1 g kobbersulfat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, i 100 ml vand.

Brij-35-opløsning, 30% w/v: Kommerciel opløsning (Sigma catalog no. 430AG-6) af 30% 23-laurylæter. Anvendes i imidasol-bufferopløsning til indvendig smøring af pumpe-slanger.

Cadmium, Cd: Granulat af cadmium, Cd, med kornstørrelse ca. 0,5 mm. Anvendes til reduktorkolonne. Bemærk at cadmium er et meget giftigt metal, der kun langsomt udskilles af organismen, således at risiko for kronisk forgiftning er stor.

Imidazol-buffer: Opløs under omrøring 27,2 g imidazol, $\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_2$ (Merck no. 1.04716) i 1000 ml vand. Tilsæt dernæst 20 ml 1 mM kobbersulfat-opløsning og 2 ml 30% Brij-35-opløsning. Fortynd med vand til 1990 ml. Når reagenserne er opløst indstilles til pH 8,0 med ca. 10 ml 3 M saltsyre. Holdbar i flere måneder.

Farvereagens: Tilsæt 100 ml 85% fosforsyre, H_3PO_4 (densitet = 1,71 g/ml) til 600 ml vand. Tilsæt dernæst 40 g sulfanilamid, $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$, og 2 g N-(1-naphtyl)-ethylenediamin dihydrochlorid, $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$. Opløses under omrøring med varme. Efter afkøling fortyndes med vand til 1 liter. Opbevares i mørk flaske. Hvis væsken bliver rødlig, skal den kasseres.

Bærevæske, 100‰ stamopløsning: Opløs 89,3 g natriumchlorid, NaCl, 28,6 g magnesiumsulfat heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, og 0,13 g natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3 , i 800 ml vand og fortynd til 1 liter. Den bærevæske, der skal anvendes ved analysen, fremstilles ved fortynding af stamopløsningen med vand, sådan at bærevæsken får samme salinitet som prøverne. Fortynding af prøver samt fremstilling af standarder skal altid foretages med en bærevæske af samme salinitet som prøverne.

Nitrat-stamopløsning, 30 mM: Afvej 3,033 g tørret kaliumnitrat, KNO_3 , der i forvejen er tørret ved 105°C i 2 timer og afkølet i eksikator. Opløses i ca. 500 ml vand og fortyndes med vand til 1 liter i målekolbe. Tilsæt en dråbe chloroform, CHCl_3 , som konserveringsmiddel. Opbevares i glasflaske i køleskab. Holdbar i flere måneder.

Nitrit-stamopløsning, 30 mM: Afvej 2,070 g tørret natriumnitrit NaNO_2 , der i forvejen er tørret ved 105°C i 2 timer og afkølet i eksikator. Opløses i ca. 500 ml vand og fortyndes med vand til 1 liter i målekolbe. Tilsæt en dråbe chloroform, CHCl_3 , som konserveringsmiddel. Opbevares i glasflaske i køleskab. Holdbar i flere måneder.

3.2.1 Aktivering af cadmium

Vask ca. 20 g cadmiumkorn i et bægerglas, først med vand og derefter med 0,5 M saltsyre. Skyl derefter igen metalkornene godt med vand. Påfyld 100 ml af 1% kobbersulfat-opløsningen til cadmiumkornene og omrør 1 min. Skyl med vand indtil opløsningen er farveløs. Cadmiumkornene skylles igen i 1 min. i 1% kobbersulfat-opløsningen, herefter skylles der 6-8 gange med vand. Den aktiverede cadmium opbevares under vand, så den ikke kommer i kontakt med luft. Aktivering af cadmium skal foregå i stinkskaab.

3.2.2 Cadmiumsøjle

Søjle til påfyldning af det aktiverede cadmium er en 100 mm lang polypropylenslange (2 mm ID), som i stinkskaab fyldes med cadmiumkornene, uden at disse kommer i kontakt med luft.

3.3 Koncentrationbestemmelse af NO_3^- og/eller NO_2^- , automatiseret

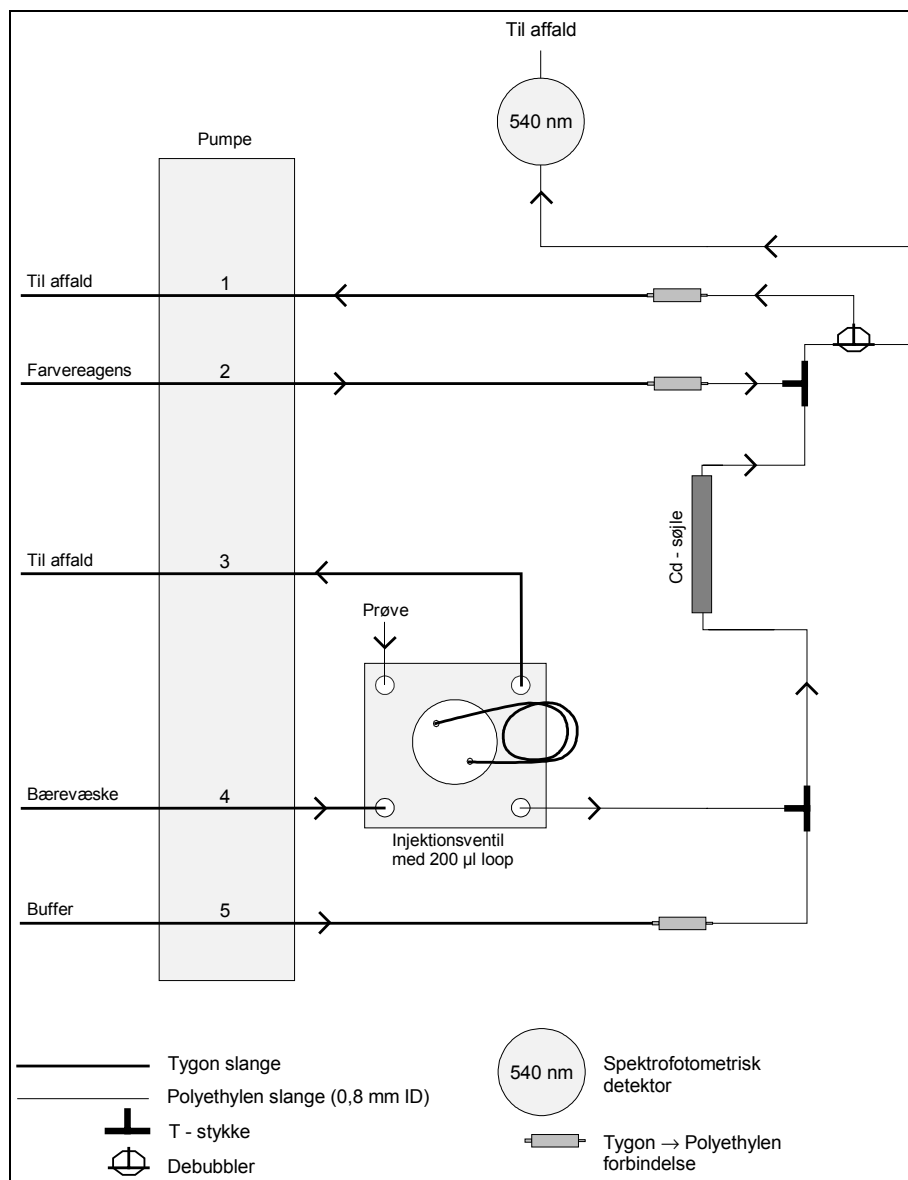
Selve reduktionen af NO_3^- til NO_2^- samt reagenstilsætning og efterfølgende måling af farveudvikling på spektrofotometer kan foretages på både autoanalysator eller flow injection analysator (FIA). Et væld af forskellige apparater såvel som et utal af metoder, reagenser, tilsætningsforhold etc. findes på markedet. Her gennemgås én opsætning som fungerer på de fleste automatiserede analysatorer (Figur 1).

Der anvendes Tygon®-pumpeslanger i størrelser som i kombination med den valgte pumpe giver nedenstående flowrater. Den øvrige del af flowvejen i systemet udgøres af polyethylen slanger, 0,8 mm (ID). Debubbleren fjerner de mikrobobler, der måtte dannes og forhindrer disse i at interferere med absorbansmålingen i fotometeret. Flowraterne for de enkelte pumpeslanger er (ml/min): 1) Affald: 0,41, 2) farvereagens: 0,56, 3) affald: 0,71, 4) bærevæske: 0,41, 5) buffer: 1,57. Til måling af NO_2^- anvendes samme opsætning, blot uden cadmiumsøjlen. Tilførsel af prøve (vol. 200 μl) til injektionsventilen sker normalt med autosampler, men kan også foregå manuelt. Intervallet mellem to prøver afpasses, således at absorbansen af en enkelt prøve kan bestemmes uden interferes fra øvrige prøver. Husk at ryste optøede prøver meget kraftigt før delprøver udtages, så de udfrosne salte fordeles homogent i opløsningen.

3.3.1 Standardkurver og måleområde

Standardprøver til fremstilling af standardkurve skal afpasses således, at alle prøver giver absorbanser, der ligger i et lineært område mellem absorbansen for hhv. højeste og laveste standard. Prøver, der ligger udenfor dette koncentrationsområde, skal fortyndes med bærevæske og re-analyseres. Udstrækningen af det lineære område afhænger af opsætningen og skal bestemmes eksperimentelt for både NO_2^- og NO_3^- .

Absorbansen er salinitetsafhængig, og standarder blandes derfor i bærevæske med samme salinitet som prøverne.



Figur 1 Flowdiagram ved automatiseret nitrat/nitrit analyser. Flowrater de (ml/min): 1) Affald: 0,41, 2) farvereagens: 0,56, 3) affald: 0,71, 4) bærevæske: 0,41, 5) buffer: 1,57.

3.3.2 Kontrol af cadmiumsøjles reduktionseffektivitet

Cadmiumsøjles reduktionseffektivitet skal kontrolleres hver gang, der køres prøver og jævnligt under målingerne. Det foregår ved, at man sammenligner absorbansen af 30 µM NO₂⁻ og 30 µM NO₃⁻-stamopløsninger. Når reduktionseffektiviteten bliver mindre end 90 % skal cadmium søjlen aktiveres eller udskiftes.

3.4 Interferens

Bestemmelsen af NO₃⁻ og NO₂⁻ i havvand er uden interferens, så længe salinitet af prøve og standarder er ens. Dog kan prøver med højt sulfid indhold meget hurtigt ødelægge effektiviteten af cadmiumsøjlen.

3.5 Referencer

Dansk Standard DS 223, December 1975: Vandundersøgelse. Bestemmelse af summen af nitrit- og nitratnitrogen. 1.udg. 7 s.

Grasshoff, K., 1983: Determination of nitrite. In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M. og Kremling, K. Methods of Seawater Analysis. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 139-142.

Grasshoff, K., 1983: Determination of nitrate. In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M. og Kremling, K. Methods of Seawater Analysis. Verlag Chemie, Weinheim, pp.143-150.

Bilag 5.1.4

Fotometrisk bestemmelse af ammonium (NH_4^+) i saltvand

Afviger på flere punkter fra Dansk Standard DS 224, bl.a.

- phenol erstattes med natriumsalicylat i salicylat-katalysator opløsningen (Reagens I), hvorved eventuel dannelse af det flygtige og meget giftige *o*-chlorophenol undgås,
- ved absorbansmåling anvendes bølgelængde 640 nm (saltvand) eller 680 nm (ferskvand),
- prøver måles med reference til salinitetstro standardkurve og kræver derfor ingen korrektion for salteffekt.

4.1 Princip

I tilstedeværelse af natriumnitroprussid reagerer ammonium i svag alkalisk opløsning med salicylat og hypochlorit, hvorved der dannes indophenolblåt. Intensiteten af den blå farve måles spektrofotometrisk og er proportional med koncentrationen af ammonium.

Ammonium-koncentrationen angives i μM og omregnes til $\mu\text{g N/liter}$ ved multiplikation med 14,01. Metoden kan anvendes direkte indenfor standardkurvens lineære område op til ca. 80 μM .

4.2 Reagenser

Til fremstilling af reagenser, fortyndinger samt skylning af glasvarer og apparatur skal anvendes destilleret eller rensat demineraliseret vand. f.eks. fra MILLI-Q eller Elgastat Maxima anlæg. Om nødvendigt skal vandets og reagensernes ammonium-indhold kontrolleres.

Alle reagenser skal være af analysekvalitet, hvor intet andet er anført.

Samtligt glasudstyr, der anvendes i fremstillingen og til opbevaring af reagenser, stamopløsninger, standarder og bestanddele deraf skylles grundigt - først i 10 % saltsyre og derefter i vand. Der anvendes handsker i alle analysens trin for at undgå ammonium-kontaminering fra hænder. Analysen bør udføres i et "ammonium-frit" lokale.

For at minimere risikoen for optagelse af ammonium fra luften bør kemikalier, der anvendes til analysen efter åbning, opbevares tæt tillukket - f.eks. i plastposer. Kemikalier, der ønskes anvendt til ammonium analyse, bør ikke anvendes til andre formål end dette.

Reagensglas til opbevaring og analyse af prøver skal tilproppes før og efter hver enkelt overførsel. Når en ny pakning af reagensglas hhv. propper åbnes, tilproppes glassene hurtigst muligt. Brug handsker.

Vand optager let ammoniak fra luften. Prøver, reagenser og kalibreringsopløsninger bør derfor opbevares i godt tillukkede flasker eller kolber. Under analysen bør disse ikke stå åbne længere tid end højst nødvendigt. Der må ikke anvendes ammoniakopløsninger i laboratoriet eller tilstødende lokaler under analysen.

Salicylat-catalysator opløsning, Reagens I: Opløs 440 g natriumsalicylat, $(C_6H_4)OHCOONa$, og 0,28 g natriumnitroprussid, $Na_2Fe[(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$ i vand og fortynd til 1000 ml. Opløsningen opbevares i mørk glasflaske i køleskab. Reagenset bliver med tiden mørkere (absorbansen øges), men er stabil i mindst 3 måneder.

Alkali-citrat opløsning: Opløs 18,5 g natriumhydroxid, $NaOH$, og 100 g *tri*-natriumcitrat, $Na_3[COH(CH_2COO)_2COO] \cdot 2H_2O$, i vand og fortynd til 1000 ml. Opløsningen opbevares i køleskab og er stabil i ubegrænset tid.

Natriumhypochlorit opløsning, 5%: Fremstilles ved 3x fortynding med vand af 15% natriumhypochlorit, $NaClO$, (fx Bie & Berntsen 15 vol %). Fortyndes umiddelbart inden brug. Den ufortyndede hypochlorit opløsning opbevares i mørk glasflaske i køleskab.

Alkali-hypochlorit opløsning, Reagens II: Fremstilles ved at fortynde 5% natriumhypochlorit-opløsningen med alkali-citrat opløsningen, 1:9. Reagenset skal anvendes inden for 1 time efter fremstilling.

Ammonium-stamopløsning, 25 mM: Opløs 1,337 g ammoniumchlorid, NH_4Cl (der i forvejen er tørret ved $60^\circ C$ i ca. 2 timer og afkølet i eksikator), i vand og fortynd til 1000 ml. Tilsæt 1 dråbe chloroform, $CHCl_3$, som konserveringsmiddel. Stamopløsningen opbevares i glasflaske i køleskab. Holdbar i flere måneder.

Ammonium-standardopløsning, 100 μM : Overfør 400 μl 25mM ammonium-stamopløsning til en 100 ml målekolbe og fortynd til mærket med kunstigt havvand af samme saltholdighed som prøven $\pm 5\%$.

Kunstigt havvand, 100‰: Opløs 89,3 g natriumchlorid, $NaCl$, 28,6 g magnesiumsulfat heptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, og 0,13 g natriumhydrogencarbonat, $NaHCO_3$, i 800 ml vand og fortynd til 1000 ml. Opløsningen opbevares i køleskab og er holdbar i ca. 1 måned.

4.3 Koncentrationsbestemmelse af NH_4^+ - absorptionsmåling

Ved måling af ammonium i saltvandsprøver skal evt. fortyndinger foretages med kunstigt havvand, og standarder skal ligeledes fremstilles i kunstigt havvand, alle med en saltholdighed, der svarer til prøvens $\pm 5\%$.

4.3.1 Bestemmelse af farve-reagensets absorptionskoefficient, NH_4^+ -standardkurve

1. Overfør 0 μl , 100 μl , 200 μl , 500 μl , 1000 μl , 2000 μl , 4000 μl , 6000 μl og 8000 μl af ammonium-standardopløsningen (100 μM NH_4^+) til 10 ml målekolbe og fortynd prøverne med kunstigt havvand til et total volumen på 10 ml. Herved fås flg. NH_4^+ koncentrationer: 0 μM (dvs., blank-prøven), 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM , 60 μM og 80 μM NH_4^+ .
2. Overfør 2,5 ml standard til et nyt plastreagensglas m/prop.
3. Tilsæt 300 μl Reagens I og bland (Whirley mixer).
4. Tilsæt 500 μl Reagens II, bland (Whirley mixer) og stil prøven i mørke.
5. Farvreaktionen er fuldstændig efter 1 time, og absorptionsen af den blå farve måles ved 640 nm (saltvand) og 680 nm (ferskvand) i 1 cm kuvette efter at spektrofotometeret er nul-stillet ved brug af blank-prøven. Prøven er stabil i op til 3 timer

Ud fra hældningen af standardkurven beregnes indophenolblåt's absorptionskoefficient, α , μM per abs. enhed. Kontroller kalibreringskurven regelmæssigt.

4.3.2 Bestemmelse af NH_4^+ koncentration i fersk- og saltvand

Frosne tøs op og rystes meget kraftigt, så de udfrosne salte fordeles homogent i opløsningen, før delprøver udtages.

1. 2,5 ml (evt. fortyndet) prøve overføres til et nyt plastreagensglas m/prop.
2. Tilsæt 300 μl Reagens I og bland (Whirley mixer).
3. Tilsæt 500 μl Reagens II, bland (Whirley mixer) og stil prøven i mørke.
4. Farvreaktionen er fuldstændig efter 1 time, og absorptionsen af den blå farve måles ved 640 nm (saltvand) og 680 nm (ferskvand) i 1 cm kuvette efter at spektrofotometeret er nul-stillet ved brug af blank-prøve (kunstigt havvand af samme saltholdighed som prøven $\pm 5\%$ tilsat farvareagenser). Prøven er stabil i op til 3 time.

Koncentrationen af NH_4^+ (μM) i den målte prøve beregnes ved:

$$[\text{NH}_4^+] = \alpha \times A \times F$$

hvor

α er indophenolblåt's absorptionskoefficient, μM per abs. enhed, ved den aktuelle salinitet

A er absorbansen målt med blank-prøven som referenceopløsning,

F er fortyndingen af prøven.

4.4 Interferens

Fe(III) koncentrationer over 90 μM interfererer pga. egenfarve. Koncentration af svovlbrinte > 60 μM interferer, men da NH_4^+ koncentrationen i sulfidholdige prøver som regel er forholdsvis høj, kan interferens undgås ved at fortynde prøverne. For at hindre udfældninger af magnesium og calcium i form af hydroxider, særlig i havvandsprøver, kompleksbindes disse ved tilsætning af citrat.

4.5 Referencer

Dansk Standard DS 224, December 1975: Vandundersøgelse. Bestemmelse af ammonium-nitrogen. 1. udg. 6 s.

Bower, C.E. & Holm-Hansen, T. 1980: A salicylate-hypochlorit method for determining ammonia in seawater. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37: 794-798.

Bilag 5.1.5

Skema 1 - Station, vand og sediment

STATION

Institution:	
Stations nr.:	Lokalitet:
Officielle pos.: WGS 84	Vandybde (m): bredde (N) længde (Ø)

GENERELLE OPLYSNINGER I FORBINDELSE MED PRØVETAGNINGEN

Stationsdata			
Dato:		Tidspunkt:	
Aktuelle pos.: WGS 84	bredde (N)	længde (Ø)	GMT
vandybde (m):		Secchi-dybde (m):	
bølgehøjde (m):	lysintensitet ($\mu\text{E m}^{-2} \text{sek}^{-1}$):	overflade	bund
	lysdæmpning ^v /bund:		% af overflade
vejret:		vindretning:	
skydække: /8		vindstyrke (m/s)	
Indsamling af sediment og bundvand			
Prøvetager:			
Udtagningsudstyr (bundhenter)		Udtagningsudstyr (vandhenter)	
<input type="checkbox"/> Kajak-bundhenter		<input type="checkbox"/> pumpe	
<input type="checkbox"/> HAPS eller boxcorer		<input type="checkbox"/> <i>in situ</i> v/dykker /"til fods"	
<input type="checkbox"/> Multiple corer		<input type="checkbox"/> "flaske" (Niskin-vandhenter)	
<input type="checkbox"/> <i>in situ</i> v/dykker /"til fods"			
forstyrrelse af sediment*:		sediment i bundvandet*:	
benyttes CTD? <input type="checkbox"/> NEJ <input type="checkbox"/> JA		hvis ja, springlagsdybde (m):	
Analyser	overflade	bund	analyselaboratorium analytiker dato metode
temp. (°C)			
salin. (‰):			
ilt (mg l^{-1})			
ilt (μM)			
bundvandets luftmætning (%):			

* angiv 00 (ingen), 10 (lidt), 20 (meget)

Skema 2 - Sedimentoverfladen

Institution: _____

Stations nr.: _____ Dato (for prøvetagning): _____

BESKRIVELSE AF SEDIMENTOVERFLADEN

Overflade

Obsansvarlig: _____ institution: _____

Obs. tidspunkt: _____
GMT

- | farve | struktur | tekstur |
|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> sort | <input type="checkbox"/> jævn | <input type="checkbox"/> grus |
| <input type="checkbox"/> hvid | <input type="checkbox"/> ujævn | <input type="checkbox"/> sand |
| <input type="checkbox"/> grå | <input type="checkbox"/> sprækket | <input type="checkbox"/> silt & ler |
| <input type="checkbox"/> lysebrun | <input type="checkbox"/> flaget | |
| <input type="checkbox"/> mørkebrun | <input type="checkbox"/> tottet | |

største mineral partikel (mm): _____

Sedimentbelægning

- | belægning | dækningsgrad |
|---|--------------|
| <input type="checkbox"/> diatoméer | _____/8 |
| <input type="checkbox"/> blå-grønne alger | _____/8 |
| <input type="checkbox"/> Beggiatoa | _____/8 |

Sedimentmakrofauna

- | makrofauna | type | dækningsgrad |
|-----------------------------------|-------|--------------|
| <input type="checkbox"/> levende | _____ | _____/8 |
| <input type="checkbox"/> døde | _____ | _____/8 |
| <input type="checkbox"/> fækalier | _____ | _____/8 |
| <input type="checkbox"/> faunarør | _____ | _____/8 |
| <input type="checkbox"/> skaller | _____ | _____/8 |

Skema 3 - Sedimentzonering

Institution: _____
Stations nr.: _____ **Dato (for prøvetagning):** _____

SEDIMENTZONERING

Obsansvarlig: _____ **institution:** _____

mm	farve					struktur			tekstur			lejring			biologi			
	sort	hvid	grå	lysebrun	mørkebrun	sammenhængende	løs	flydende	grus	sand	silt & ler	synlig lagdeling	skrålejring	gradvise overgange	oprodning	åbne gange	Beggiatoa	skaller
0																		
12																		
14																		
16																		
18																		
20																		
22																		
24																		
26																		
28																		
30																		
32																		
34																		
36																		
38																		
40																		
46																		
52																		
58																		
64																		
70																		
76																		
82																		
88																		
94																		
100																		

Skema 4 - Ilt- og næringsstofflux (1)

Institution: _____ Stations nr.: _____ Dato (for prøvetagning): _____

ILT- OG NÆRINGSSTOFFLUXE (1)

Forsøgslaboratorium: _____																					
luftmætning ved inkubation																					
<input type="checkbox"/> 0%	<input type="checkbox"/> 50%																				
<input type="checkbox"/> 20%	<input type="checkbox"/> 100%																				
<input type="checkbox"/> <i>in situ</i> luftmætning																					
inkubationstemp. °C: _____																					
LYS	MØRKE																				
dato f. inkubation: _____	_____																				
ansvarlig f. inkubation: _____	_____																				
anvendt lysintensitet ved sediment- overfladen ($\mu\text{M m}^{-2} \text{sek}^{-1}$) _____																					
	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%; padding: 2px;">analyzelaboratorium</th> <th style="width: 25%; padding: 2px;">analytiker</th> <th style="width: 25%; padding: 2px;">dato</th> <th style="width: 25%; padding: 2px;">metode</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">ilt</td> <td style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">nitrit og nitrat</td> <td style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">ammonium</td> <td style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">fosfat</td> <td style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></td> </tr> </tbody> </table>	analyzelaboratorium	analytiker	dato	metode	ilt				nitrit og nitrat				ammonium				fosfat			
analyzelaboratorium	analytiker	dato	metode																		
ilt																					
nitrit og nitrat																					
ammonium																					
fosfat																					

Skema 5 - Ilt- og næringsstofflux (2)

Institution:	
Stations nr.:	Dato (for prøvetagning):

ILT- OG NÆRINGSSTOFFLUX (2)

	KONTROL			SEDIMENT				
MØRKE	K-1	K-2	K-3	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5
vandsøjle (mm)								
start (kl.)								
stop (kl.)								
ilt (μM)								
nitrit+nitrat (μM)								
ammonium (μM)								
fosfat (μM)								
LYS								
vandsøjle (mm)								
start (kl.)								
stop (kl.)								
ilt (μM)								
nitrit+nitrat (μM)								
ammonium (μM)								
fosfat (μM)								