



Sveriges lantbruksuniversitet  
Institutionen för mark och miljö

## **Kan kväve bevaras i dräneringsvatten från åkermark som lagras i dammar?**

### **- Ett laboratorieförsök**

*Is it possible to keep nitrogen dissolved in drainage water stored in ponds?*

Dennis Wiström



SLU, Sveriges lantbruksuniversitet  
Institutionen för mark och miljö

Dennis Wiström

Kan kväve bevaras i dräneringsvatten från åkermark som lagras i dammar? - Ett laboratorieförsök  
Is it possible to keep nitrogen dissolved in drainage water stored in ponds?

Handledare: Ingrid Wesström, institutionen för mark och miljö, SLU och Mikael Pell, institutionen för mikrobiologi, SLU

Examinator: Anna Mårtensson, institutionen för mark och miljö, SLU  
EX0445, Självständigt arbete i biologi, 30 hp, Avancerad D  
Agronomprogrammet – inriktning mark/växt 270 hp

Examensarbete, institutionen för mark och miljö, SLU 2009:03  
Uppsala 2009

Nyckelord: Kväve, nitrat, denitrifikation, vatten, övergödning, växtnäring



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

REFERAT .....	3
ABSTRACT .....	3
INLEDNING .....	4
Syfte .....	4
Avgränsningar .....	4
BAKGRUND .....	5
Grundämnet kväve .....	5
Kvävets bakteriella processer .....	5
Assimilation .....	5
Denitrifikation .....	6
Ammonifikation .....	7
Nitrifikation .....	7
Kvävets kretslopp i limniska system .....	8
Kväve i bevattningsdammar .....	9
Syrets löslighet i vatten .....	10
MATERIAL OCH METODER .....	10
Produktion av syrefritt vatten (delförsök 1) .....	10
Metod för syremätning .....	11
Denitrifikationspotential, PDA (delförsök 2) .....	11
Sediment .....	11
Bestämning av PDA .....	11
Pilottest av parametrar (delförsök 3) .....	12
Huvudexperiment .....	12
RESULTAT .....	13
Delförsök 1 - Syrefritt vatten .....	13
Delförsök 2 – Denitrifikationspotential (PDA) .....	13
Delförsök 3 – Test av parametrar och inställningar .....	14
Huvudexperimentet .....	15
DISKUSSION .....	18
Slutsatser .....	20
TACK .....	21
REFRENSER .....	22
Bilaga 1. Beräkningar .....	23
Bilaga 2. Spädningsserier till gaskromatografen .....	24
Bilaga 3. Information om Spektrofotometern och analysinstrument .....	25

## REFERAT

Syftet med föreliggande arbete har varit att se om man kan bevara växttillgängligt kväve i form av nitrat i bevattningsdammar från en säsong till nästkommande år genom att ha en hög syrehalt i vattnet. Huvudexperimentet är utfört på laboratorium där syntetiskt dräneringsvatten har framställts. Nitrathaltens förändring i en syrerik miljö och en syrefattig miljö har sedan jämförts. I denna rapport beskrivs också metoder för att skapa syrefritt vatten och för att mäta denitrifikationspotentialen i å-sediment. Innan huvudexperimentet genomfördes gjordes ett pilotförsök för att testa systemet inför huvudförsöket. Pilotförsöket och huvudförsöket visade dock resultat som pekade åt olika håll. I pilotförsöket sjönk nitrathalten i både den syrerika och den syrefattiga miljön, men efter en tid steg åter nitrathalten i den syrerika miljön och närmade sig den ursprungliga nivån. Även i huvudexperimentet sjönk nitrathalterna i båda miljöerna men trots en längre tids mätning steg aldrig nitrathalten i den syrerika miljön utan stannade nära noll i båda miljöerna. Med utgångspunkt från resultatet från huvudexperimentet kan man inte dra några slutsatser om att man kan bevara nitrat i vatten genom att hålla en hög syrehalt. Detta eftersom nitrathalten i huvudexperimentet sjönk över tiden i såväl den syrefattiga miljön som i den syrerika. Det skulle kunna vara så att de mikrobiella samhällena i de två miljöerna har utvecklats helt olika. I den syrefattiga miljön har vi denitrifikation och i den syrerika miljön pågår immobilisering av biomassa alternativt mineralisering till nitrifikation.

## ABSTRACT

The aim of this thesis was to examine if it is possible to keep nitrogen in the form of nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) in ponds from one season to another by keeping a high concentration of oxygen in the pond water. This hypothesis was tested by doing a lab experiment where two systems were compared according to nitrate concentration. One system had high concentration of oxygen in the water and one had low concentration of oxygen. Before the main experiment was conducted I did a pilot study to test the system setup and included parameters. The result from this study and the main study did not show the same result. In both studies the nitrate concentration decreased in the beginning of the experimental period. In the main study the concentration of nitrate remained close to zero. While in the pilot study the nitrate concentration increased back up close to the starting level in the system with high oxygen concentration. From this result it is not possible to come to any conclusions regarding the influence of oxygen concentration on nitrate concentration. One possible reason why the two experiments showed different results is that the microbial activity was different in the two systems.

## **INLEDNING**

Att kunna återanvända näringsämnen som finns i dräneringsvattnet är en viktig del av ett hållbart jordbruk. Genom att ta tillvara kvävet i dräneringsvattnet för bevattning och gödsling av nya grödor kan man minska övergödningens problematik i vattendrag och med allt högre gödselmedelspriser skulle man samtidigt kunna minska de ekonomiska utgifterna på gårdsnivå. Kväve är i de flesta fall det tillväxtbegränsande näringsämnet för växterna och tillförseln av kväve är därför mycket betydelsefull för den slutgiltiga växtproduktionen.

Idag ligger fokus mest på att minska övergödningen av vattendragen, bland annat med hjälp av våtmarker som tar bort kvävet från vattnet under syrefria förhållanden. I våtmarker kan denitrifikation pågå som gör att nitrat övergår till lustgas, kväveoxid eller kvävgas beroende på syrehalten i vattnet. Genom att kvävet försvinner upp i luften i samband med denitrifikation i våtmarken minskar kvävebelastningen på de efterföljande vattensystemen. Man tar dock inte hänsyn till den klimatpåverkan som gasavgången för med sig. En mer långsiktig lösning ur miljösynpunkt vore att återanvända kvävet från dräneringsvattnet som redan finns i växttillgänglig form och på så sätt minska både transporter och tillverkningskostnader för kvävegödselmedel. Att återanvända dräneringsvattnet genom att lagra det i bevattningsdammar skulle bidra till en ökad artdiversitet i jordbruket vilket bland annat är viktigt för att nå miljömålet om ökad biologisk mångfald.

Med dagens jordbrukssystem sker en borttransport av näringsämnen från gårdar till städer. Om man skulle kunna återföra en del av de näringsämnen som läcker från gården tillbaka till åkermarken nästa säsong skulle det gynna både gårdens ekonomi och miljön. Jag vill utveckla tankevägar för hur man ska kunna återanvända nitrat som redan befinner sig i växttillgänglig form.

### **Syfte**

Syftet med arbetet var att i ett försök på laboratorium undersöka möjligheterna att bevara nitrat i syntetiskt dräneringsvatten tillsammans med sediment och denitrifikationsbakterier genom att hålla en hög syrehalt i vattnet för att hindra gasformiga kväveförluster via denitrifikation. Tanken är att man ska kunna använda tekniken till bevattningsdammar för att bevara nitrat från en växtsäsong till nästkommande års växtsäsong.

### **Avgränsningar**

I försöken undersöks enbart nitrathalten i vattenfasen. Kvävetillförsel från organiskt material, den totala kväve- och kolhalten mäts inte. I försöken ges mikroberna goda förutsättningar att överleva och föröka sig genom att glukos tillsätts, vilken kommer att fungera som en lättillgänglig kol- och energikälla. Den enda parameter som varierar i försöken är syrehalten, övriga parametrar hålls konstanta eller lika mellan leden. Försöksserien genomförs enbart i laboratorieskala.

## BAKGRUND

Innan själva laborationsförsöket beskrivs ges i detta kapitel en bakgrund till några av de kemiska processer som kvävet ingår i och de miljöförutsättningar som påverkar de olika processerna. Bakgrunden beskriver även kvävet egenskaper och hur det förekommer i limniska system.

### Grundämnet kväve

Alla grundämnen strävar efter att uppnå s.k. ädelgasstruktur, vilket innebär ett stabilt tillstånd där det inte finns någon elektrisk laddning hos grundämnet. Kväveatomen har fem valenselektroner och nitridjonen ( $N^{3-}$ ) behöver ytterligare tre elektroner för att uppnå ädelgasstruktur. Därför slår sig två nitridjoner samman och delar på tre elektronpar med kovalenta trippelbindningar som är mycket starka bindningar och bildar kvävgas ( $N_2$ ). De kovalenta trippelbindningarna gör att molekylerna blir stabila. Nitridjonen kan också vara en del av komplexa molekyler, den kan oxideras och reduceras i många olika biokemiska processer. Kvävet oxidationstal varierar mellan  $-III$  till  $+V$ . I Tabell 1 nedan visas oorganiska kväveformer och dess oxidationstal som kan förekomma i limniska system (Henriksson, 2000; Silberberg, 2006).

Tabell 1. Kvävet oxidationstal i oorganiska former

Oxidationstal	-III	-I	0	I	II	III	V
Kväveform	$NH_4^+$	$NH_2OH$	$N_2$	$N_2O$	$NO$	$NO_2^-$	$NO_3^-$

I limniska system domineras kväveformen av organiskt bundet kväve som bland annat finns i levande organismer och i sedimentet i form av organiska avlagringar. Det är främst de biokemiska processerna i det limniska systemet som styr fördelningen mellan de olika kväveformerna (Pettersson & Boström, 1990; Sörensen et al 1990).

### Kvävet bakteriella processer

Kvävet är unikt då det förekommer i många valensformer vilket bakterierna utnyttjar genom att oxidera kvävet för att producera energi. Kväve kan också användas som slutlig elektronacceptor (reduceras) vid respiration samt som byggsten i biomassa. Uptag och utsöndring av kväve styrs av tillgången på kväve i förhållande till kolet, den s.k. C/N kvoten. C/N kvoten hos en bakterie är ca 10.

#### Assimilation

Assimilation är en process där oorganiskt kväve byggs in i biomassa (växt- eller djurbiomassa). Det sker till exempel vid nedbrytning av organiskt material. Mikroorganismerna som bryter ner materialet tar tillvara på de sockerarter som finns i materialet och utnyttjar detta för sin egen tillväxt. Mikroorganismerna behöver också kväve för sin tillväxt och därför kommer ammonium/nitrathalten också att minska. Vid aerob tillväxt av mikrober kommer cirka 50 procent av den totala mängden socker/glukos att immobiliseras i biomassa och resterande kommer att omvandlas till koldioxid genom mikroorganismernas cellandning.

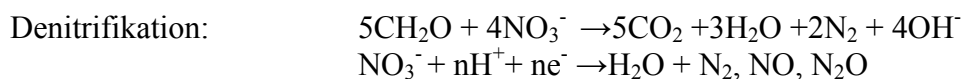


## Denitrifikation

Gynnsamma förutsättningar för att denitrifikation ska ske är låg syrehalt i vattnet, hög vattentemperatur, bra nitratillgång och neutralt pH.

Denitrifikation är en bakteriell process som reducerar kväveoxider till olika kvävgasformer där kvävgas är slutprodukt i reaktionen. Denitrifikationen är oftast en heterotrof process där energi utvinns från organiskt material. Denitrifikationen utförs av fakultativt anaeroba bakterier som har möjlighet att använda nitrat som slutlig elektronacceptor vid låga syrekoncentrationer eller i anaeroba miljöer. Tre grundläggande förutsättningar för att denitrifikation ska äga rum är tillgång på nitrat, kol- och energikälla, och att det råder anaeroba förhållanden. *Pseudomonas* är kanske det vanligaste bakteriesläktet som kan utföra denitrifikation men denitrifikation återfinns även hos många andra bakteriesläkten så som *Actinobacter*, *Bacillus*, och *Micrococcus*. Dessa bakterier har förmåga att oxidera organiskt material med hjälp av nitrat som elektronacceptor under syrefria förhållanden.

De använder syre som elektronacceptor vid nedbrytning av organiskt material i aerob miljö eftersom det ger mer energi än att använda nitrat. Höga syrehalter hämmar därför denitrifikationen. Höga halter av organiskt material gynnar denitrifikationen eftersom syre förbrukas när det bryts ner. Det är framförallt syrehalten och tillgången på organiskt material som kontrollerar denitrifikationen. I formlerna nedan visas de kemiska reaktionerna för syrerespitation och denitrifikation. (Pettersson & Boström, 1990; Sörensen et al, 1990; Jansson et al, 1991; Burt et al, 1993; Lindkvist, 1993)

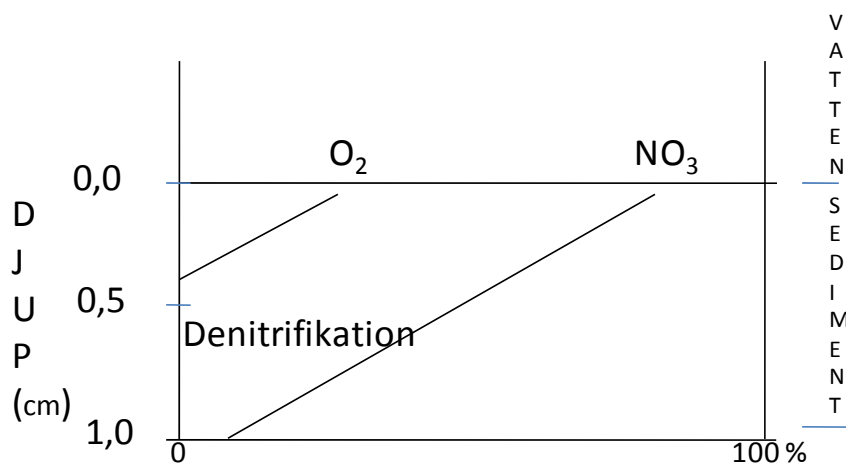


Enligt Jesper Olsson från Uppsala reningsverk är deras erfarenhet att nitrathalten i vattnet inte påverkas av denitrifikationsbakterierna om syrehalten i avloppsvattnet ligger över 2 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>. Denitrifikation sker när syrehalten ligger under 0,5 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>. Om denitrifikation sker bör en minskning av nitrathalten kunna ses inom åtta dagar (såvida inget nytt nitrat tillförs systemet) (pers. med. 2008-11-11).

Eftersom det går åt vätejoner i denitrifikationsprocessen har den en pH-höjande effekt på omgivningen. Det innebär att man kan påvisa denitrifikation genom att mäta pH. Denitrifikationspotentialen hos ett sediment kan bestämmas genom att analysera mängden lustgas som produceras i en sluten flaska över tiden med hjälp av en gaskromatograf. Man utnyttjar då att acetylen hämmar sista steget i denitrifikationsprocessen vilket medför att lustgas bildas istället för kvävgas.

Syrgas hämmar syntesen av och aktiviteten hos enzymet nitratreduktas som är aktivt vid reduktionen av nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) till nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Syrgas hämmar även alla andra N-reduktaser i denitrifikationskedjan. Det förklarar den snabba syrerregleringen, det vill säga omslaget till och från denitrifikationsaktivitet. Syrgaskoncentrationen som hämmar denitrifikationen varierar mellan de olika denitrifikationsbakterierna. Vid denitrifikation under anaeroba förhållanden använder bakterierna nitrat vid det första reduktionssteget. Efter detta steg som skapar nitrit behövs andra specifika kvävereducerande enzym samt cytokromer för den följande stegvisa reduktion som leder till produkterna kväveoxid, dikväveoxid och kvävgas.

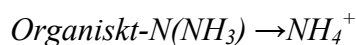
Eftersom bakteriernas utnyttjande av nitrat hämmas av en hög syrehalt i vattnet sker denitrifikationen främst i sedimentet där diffusionen av syre är långsam och en anaerob miljö lätt bildas. På grund av den långsamma diffusionen är nitratförseln också begränsande nere i sedimentet. Denitrifikationsbakterierna som förekommer i sedimentet lever i kolonier på sedimentpartiklar. Denitrifikationsaktiviteten finns från några millimeter från ytan på sedimentet ner till en centimeters djup men det kan variera mellan olika sediment. Det är sedimentets diffusionskapacitet som bestämmer bakteriernas djup i sedimentet. Nitratmolekylen diffunderar djupare ner i sedimentet än syremolekylen (Fig. 1). Det beror på att energiutbytet från syrerrespirationen är 2-3 gånger mer effektivt än denitrifikationen vilket gör att syret förbrukas innan det hunnit diffundera ner så långt i sedimentet (Sörensen et al, 1990). Kvävet från nitraten byggs inte in i bakteriecellen utan omvandlas till olika kvävgasföreningar som diffunderar ut ur cellen. (Jansson et al, 1991; Pettersson & Boström, 1990; Sörensen et al, 1990)



Figur 1. Diffusion av syre och nitrat på olika djup i ett sediment (Sörensen et al, 1990).

### Ammonifikation

Aktiviteten hos de flesta heterotrofa bakteriesläktena leder till mineralisering, det vill säga frigörandet av oorganiskt material. Vid mineraliseringen omvandlas organiskt bundet kol och kväve till koldioxid respektive ammonium via metaboliska steg som ger bakterierna både energi och byggstenar för syntes av ny cellmassa. Ammonifikation, eller kvävemineralisering, är den del av mineraliseringen som specifikt ger  $\text{NH}_4^+$  (se nedan).

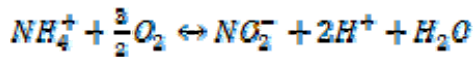


Ammonium är oftast adsorberat till sedimentpartiklar på grund av sin positiva laddning och det är bara en liten andel av  $\text{NH}_4^+$ -jonerna som är lösta i vattnet. Ammonium är en tillgång för nitrifikationsbakterierna i sedimentet eftersom de kan utvinna energi genom att omvandla  $\text{NH}_4^+$  till  $\text{NO}_3^-$  (Pettersson & Boström, 1990).

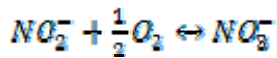
### Nitrifikation

Nitrifikation är oxidering av  $\text{NH}_4^+$  till  $\text{NO}_3^-$  som sker i två steg med hjälp av kemolitotrofa bakterier om det är aeroba förhållanden:

Steg 1: Ammoniumoxidation, utförs av bl.a. bakteriesläktet *Nitrosomonas*.



Steg 2 Nitritoxidation, utförs av bl.a. bakteriesläktet *Nitrobacter*.



En liten bakteriepopulation kan omsätta förhållandevis stora mängder ammonium. Reaktionen ger en pH-sänkning i vattnet på grund av de protoner som frigörs (Pettersson & Boström, 1990).

Nitrifikationen äger rum i temperaturintervallet 3-45°C med ett optimum runt 25-35°C.

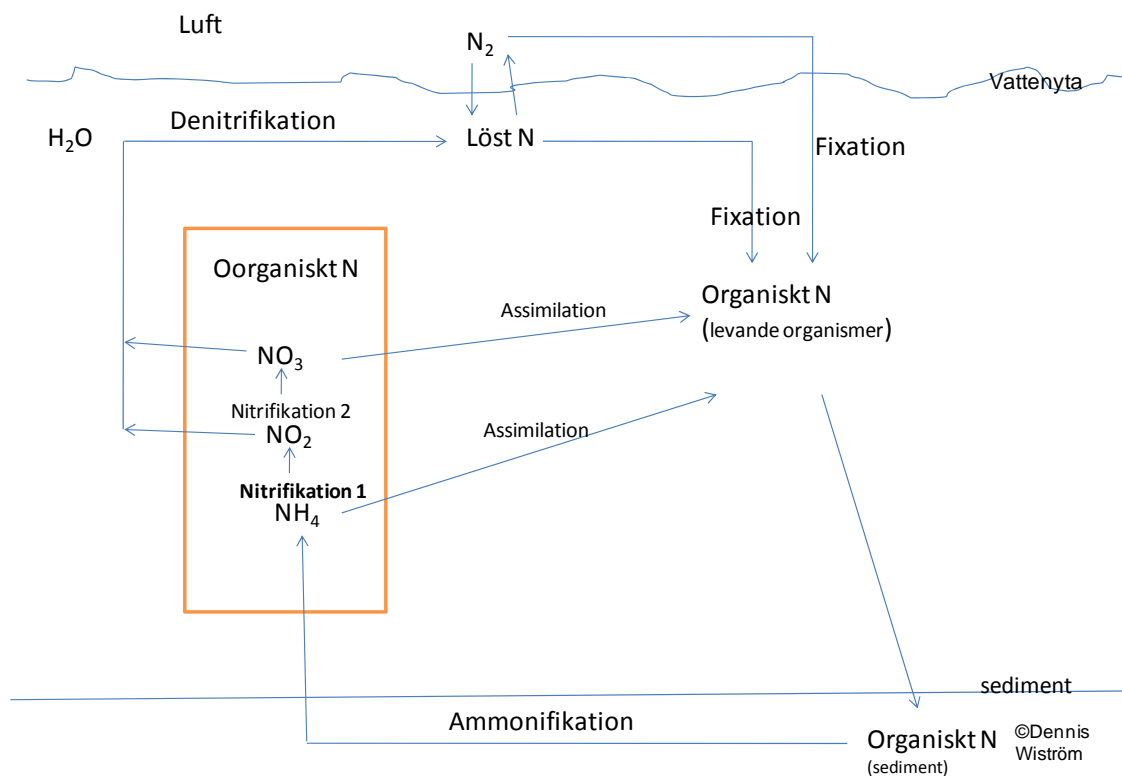
Syrgas är nödvändigt för båda oxidationsstegen i nitrifikationsprocessen. Vid låga syrgashalter ansamlas nitrit. Det beror på att det sista steget i nitrifikationsprocessen är det mest känsliga för syrebrist. Nitrifikationsprocessen upphör när syrgashalten är lägre än 0,1 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>. Även extremt höga syrgashalter kan ha en hämmande effekt på nitrifikationen men detta är ringa undersökt (Pettersson & Boström, 1990).

Bakterierna i nitrifikationsprocessen är aktiva från pH 6 till 9,5. Vid pH över 9,5 övergår NH<sub>4</sub><sup>+</sup> till NH<sub>3</sub> vilket har en giftverkan på nitrifikationsbakterierna. Giftverkan varierar med koncentrationen av ammoniak i vattnet. Det optimala pH för nitrifikationen ligger i intervallet 7-8,5 (Pettersson & Boström, 1990).

Ytterligare faktorer som påverkar nitrifikationsbakterierna är sedimentytans lämplighet för bakteriekolonier och konkurrens om sedimentytan från andra bakterier som till exempel kemoorganotrofa bakterier. Omblandning av sedimentet kan ha en positiv inverkan på nitrifikationen eftersom det bidrar till en ökad diffusion av ammonium ner i sedimentet. Förekomst av kiselalger tros ha en hämmande effekt på nitrifikationsbakterierna. Hämningen kan bero på flera olika faktorer som till exempel högt pH eller brist av ammonium, koldioxid, syregas eller organiska restprodukter (Pettersson & Boström, 1990).

### **Kvävets kretslopp i limniska system**

Kväve finns främst som kvävgas i atmosfären, kvävgasen kan vid blixurladdningar i samband med åskväder omvandlas till nitrater som faller ner med regn. Fixering av atmosfäriskt kväve kan också göras av t.ex. cyanobakterier, som omvandlar kvävgas till organiskt bundet kväve. Till luften kommer kvävet via denitrifikationen som producerar kväveoxider eller ren kvävgas (Fig. 2).



Figur 2. Kvävetts kretslopp i limniska system (efter Pettersson & Boström, 1990 och Sörensen et al, 1990).

## Kväve i bevattningsdammar

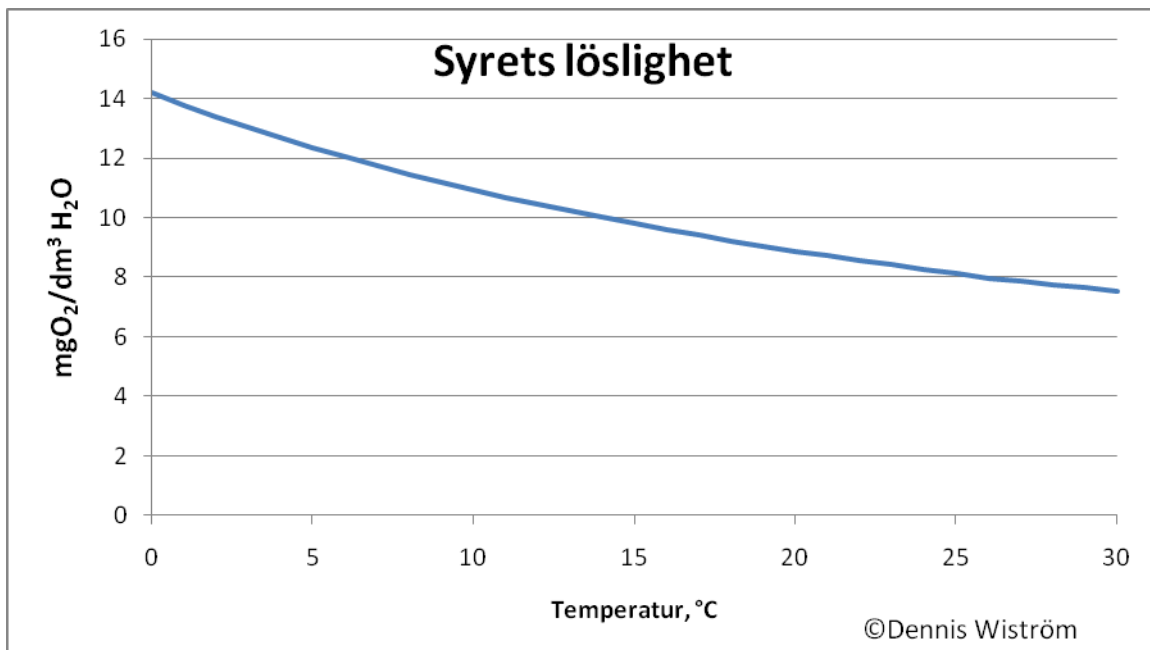
Nederbörden påverkar vattenkvaliteten i dammen, dels direkt som regn till dammen eller indirekt som avrinning från närliggande områden. Vid ytavrinning kan sediment transporteras till dammen. Ytavrinningens omfattning är beroende av regnets intensitet, marktemperatur, markfuktighet samt vegetationstyp i området. Sedimentets kemiska sammansättning kommer att påverka vattenkvaliteten i dammen. Även inströmning av grundvatten till dammen och utströmning av ytvatten från dammen kommer att påverka vattenkvaliteten eftersom volymen vatten ändras (Brainwood et al, 2004). Mängden kväve som finns i en bevattningsdamm styrs av en rad kemiska, fysikaliska och biologiska faktorer såsom:

- Tillförsel av kväve som bland annat beror av tillrinningsområdes storlek, markanvändning, punktkällor
- Hur mycket kväve som finns i dammen från början
- Kemisk reduktion av kväve, vilken är beroende av temperaturen i vattnet. Vintertid är reduktionen låg men även under 4°C kan reduktionen pågå
- Hur lång tid vattnet uppehåller sig i dammen
- Mängd och aktivitet av denitrifikationsbakterier i sedimentet
- Kvävetts form, om det är organiskt N,  $\text{NH}_4^+$  eller  $\text{NO}_3^-$
- Dammens utformning
- Vegetationsförekomst i dammen, undervattensväxter i dammen och alger kommer att påverka syrehalten i vattnet genom sin evapotranspirationen. I dammar med höga halter av nitrat och fosfor finns oftast fotosyntetiserande alger vilket ger en syreproduktion i dammen som i sin tur påverkar pH och redoxpotentialen (Brainwood et al, 2004).

Nitrathalten i dräneringsvattnet är normalt 15-30 mg NO<sub>3</sub>-N/dm<sup>3</sup> även om enstaka observationer i fält har påvisat upp till 100 mg NO<sub>3</sub>-N/dm<sup>3</sup> (Johansson & Gustafson, 2008).

### Syrets löslighet i vatten

Syrets löslighet i vatten beror av vattnets temperatur, salthalt och pH. Syrehalten avtar med stigande temperatur (Fig. 3).



Figur 3. Syrets löslighet i avjonat vatten som funktion av temperaturen vid ett syrgastryk på 101,3 kPa.

## MATERIAL OCH METODER

Experimentet delades in i fyra delar där huvudexperimentet var att försöka minimera denitrifikationsaktiviteten i dammvatten och sediment genom tillförsel av syre. Försöket genomfördes i enlitersflaskor med syntetiskt dammvatten och sediment från en å. Syretillförseln reglerades genom att antingen skapa ett övertryck av kvävgas eller luft genom bubbla de trycksatta gaserna genom vattenpelaren i flaskorna. För att kunna genomföra huvudexperimentet utfördes tre förförsök där syftet var att 1) kunna skapa syrefritt vatten till huvudexperimentet, 2) bestämma denitrifikationspotentialen i det använda sedimentet och 3) ställa in parametrar och testa materialet för att se hur systemet fungerade inför huvudexperimentet.

### Produktion av syrefritt vatten (delförsök 1)

För att skapa syrefritt vatten användes en duranflaska på 1000 cm<sup>3</sup> försedd med skruvlock och packning. I locket fanns två hål om vardera 1,5 mm i diameter, lagom för att passa till en sugcellslang med diametern 1,5 mm. En liter avjoniserat vatten mättes upp och fördes över till duranflaskan som sedan autoklaverades i 15 minuter i 121°C. Efter autoklivering

placerades duranflaskan i ett vattenbad på 100°C för att undvika att syre åter löstes i vattnet som en följd av temperaturfall. När duranflaskan var i vattenbadet anslöts en 30 cm lång sugcellsslang till ett av de två hålen på locket. Sedan anslöts kvävgas till duranflaskan genom en gummislang (innerdiameter 5 mm). Systemet flushades sedan genom att kraftigt bubbla kvävgas genom duranflaskan. Under flushningen sänktes temperaturen i vattenbadet genom att gradvis byta ut det varma vattnet i vattenbadet till rumstempererat vatten. Efter cirka 30 minuter var vattentemperaturen i duranflaskan 20°C varvid mätning påbörjades av syrekoncentrationen i vattnet med en syremätare (Hach-lang LDO; Bad Neuenahr, Tyskland). Försöket gjordes med fem upprepningar och vid varje mättillfälle gjordes tre bestämningar med tätt tidsintervall i varje flaska.

### Metod för syremätning

Syremätarens elektrod placerades i en 50 cm<sup>3</sup> bägare med vatten försedd med en cylinder av glasfiber (100 cm<sup>3</sup>) runt bägaren. Bägaren försågs med ett lock av silvertejp med två ingångar, en för slangen med kvävgas och en för sugcellsslangen. För att undvika att syre på nytt diffunderade in i bägaren hölls ett övertryck av kvävgas i bägaren genom att hela tiden tillföra kvävgas. LDO-indikatorn (luminent dissolve oxygen) placerades i centrum av bägaren. Ett vattenprov (50 cm<sup>3</sup>) från duranflaskan fördes över till bägaren med LDO-mätaren med en 60 cm<sup>3</sup> spruta försedd med en 20 cm lång sugcellsslang. Innan avläsning fylldes och tömdes bägaren med 3 x 50 cm<sup>3</sup> vatten från duranflaskan för att tvätta bort syre som eventuellt fanns i bägaren och på syremätaren.

## **Denitrifikationspotential, PDA (delförsök 2)**

### Sediment

Ca 7 dm<sup>3</sup> sediment hämtades vid Ultuna källa (ca 6 km söder om Uppsala centrum) i en 10 dm<sup>3</sup> hink. Sedimentet togs från botten från en yta på ca 1 m<sup>2</sup> och 5 cm djup. Större växtdelar och organiskt material rensades bort för att erhålla så mycket mineralsedimentet som möjligt. Sedimentet transporterades omedelbart till labbet där ytterligare organiska material tvättades bort med hjälp av en tunna på 15 liter som fylldes med avjoiserat vatten och sedimentprovet. Genom att röra runt i tunnan kunde ytterligare en hel del växtrester avlägsnas. Suspensionen fick sedimentera varefter det översta vattensiktet hälldes av och resterande sediment tappades på en 10 dm<sup>3</sup> dunk som förvarades i 2°C fram till försöket. För bestämning av sedimentets torrvikten vägdes 10 g sediment in i aluminiumformor som placerades i 105°C i 24 timmar varefter utvägning gjordes.

### Bestämning av PDA

Nio stycken duranflaskor (250 cm<sup>3</sup>) försågs med vardera 25 g sediment varefter de förslöts med skruvkork och membranpackning och fick stå i 25°C över natten. Till varje flaska sattes sedan 25 cm<sup>3</sup> av en substratblandning med glukos och 1 mM KNO<sub>3</sub> (303 g/dm<sup>3</sup>). Glukoskoncentrationen var i tre av flaskorna 1 mM (150 g/dm<sup>3</sup>) och i ytterligare tre av flaskorna 0,5 mM. Till de tre sista flaskor sattes ingen glukos. Efter substrattillsatts förslöts duranflaskorna gastätt för att sedan evakueras och flushas 5 gånger med kvävgas. Till sist injicerades 25 cm<sup>3</sup> acetylen med en 50 cm<sup>3</sup> spruta till varje flaska. Acetylen gör så att det sista steget i denitrifikationskejan inhiberas vilket gör att slutprodukten blir lustgas istället för kvävgas. Tiden för substrattillförseln och acetylentillförseln noterades för de olika duranflaskorna. Duranflaskorna transporterades till ett konstantrum med 25°C där de ställdes

på ett skakbord justerat till 175 rpm (varv per minut). Det första gasprovet togs 15 minuter efter att acetylen hade tillsatts. Skakbordet med de 9 duranflaskorna stängdes av vid provtagningen och 0,5 cm<sup>3</sup> gas togs ut från varje duranflaska med en 1 cm<sup>3</sup>spruta försedd med kanyl. Gasproverna applicerades sedan i en 10-cm<sup>3</sup> gastät vial för vidare analys med gaskromatografi. Från varje duranflaska togs 7 stycken prover ut med 30 minuters mellanrum. För den gaskromatografiska analysen gjordes en spädningsserie av ren lustgas i 12 stycken 118 cm<sup>3</sup> flaskor försedda med gastäta butylgummisepta som hade evakuerats och flushats 5 gånger med kvävgas. Efter spädning erhöles en serie koncentrationer i intervallet 0,7 – 350 ppm N<sub>2</sub>O vilka användes för att kunna kalibrera gaskromatografen (Bilaga 2).

### Pilottest av parametrar (delförsök 3)

I delförsök 3 använde jag mig av två duranflaskor (A och B) om vardera 1000 cm<sup>3</sup>. Båda behandlades för att ge syrefria förhållanden enligt delförsök 1 ovan. Den ena av flaskorna luftades i slutet för att skapa syrerika förhållanden. Till flaskorna tillsattes glukos, KNO<sub>3</sub>, vatten och sedimentsuspensionen (Tabell 2).

Tabell 2. Innehåll i duranflaskorna till delförsök 3

	A (syrerik miljö)	B (syrefri miljö)
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (g)	0,155	0,155
KNO <sub>3</sub> (g)	0,304	0,304
H <sub>2</sub> O (avjonat) (dm <sup>3</sup> )	0,6	0,6
Sediment från Ultuna källa (cm <sup>3</sup> )	100	100
NO <sub>3</sub> -N, uppmätt (mg/dm <sup>3</sup> )	66,5	63,6
O <sub>2</sub> , uppmätt (mg/dm <sup>3</sup> )	8,56	1,11
Total volym (dm <sup>3</sup> )	0,7	0,7

Innan försöket startade mättes halten av nitratkväve och syre i de båda flaskorna (Tabell 2). Flaskorna behandlades efter metoden för syrefritt vatten.

### Huvudexperiment

Experimentet genomfördes i ett rum med en konstant temperatur på 20°C. Avjoniserat vatten (1000 cm<sup>3</sup>) mättes upp i vardera 16 stycken duranflaskor, som sedan autoklaverades. För att få syrefritt vatten i alla flaskorna användes metoden för syrefritt vatten (se ovan). Ur varje flaska togs 50 cm<sup>3</sup> för mätning av syrehalten. Ytterligare 50 cm<sup>3</sup> togs sedan ut för att uppnå en volym på 900 cm<sup>3</sup> vatten i varje duranflaska. Detta för att få plats med 100 cm<sup>3</sup> sedimentsuspension.

Två stamlösningar bereddes, en med glukos (30,013 mg/dm<sup>3</sup>) och en med KNO<sub>3</sub> (22,025 mg/dm<sup>3</sup>) (för beräkningar av koncentrationer, se Bilaga 1). Stamlösningarna upphettades med hjälp av ett vattenbad till 90°C för att minska den lösta halten syre i vattnet.

Av stamlösningarna tillsattes till varje flaska 4 cm<sup>3</sup> glukoslösning och 9 cm<sup>3</sup> kaliumnitratlösningen vilket gav en slutlig koncentration i flaskorna på 0,15 och 30 mg/dm<sup>3</sup> av glukos respektive KNO<sub>3</sub>. Vid appliceringen av nitrat och glukos användes 10 cm<sup>3</sup> sprutor som först sköljdes med stamlösningen innan själva appliceringen för att minska kontamineringsrisken mellan flaskorna.

Som negativ kontroll bereddes en flaska med enbart tillsats av kaliumnitrat (30 mg/dm<sup>3</sup>, se bilaga 1). Detta för att se om något händer med nitraten när det är löst i vattnet utan sediment.

Alla flaskor förutom den negativa kontrollen slumpades i två grupper, A- respektive B-led i försöket. Flaskorna i A-ledet fick kontinuerlig tillförsel av luft från rummet via en luftpump och flaskorna i B-ledet fick kontinuerlig gastillförsel i form av N<sub>2</sub>, för att skapa en syrerik respektive syrefattig miljö. När syrejämvtikt (runt 8 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>) rådde i A-ledet efter cirka 30 minuter tillfördes 100 cm<sup>3</sup> suspension till alla 16 flaskorna. Appliceringen av suspensionen skedde med hjälp av ett 100 cm<sup>3</sup> mätglas. Dunken med sedimentet skakades väl före varje uppmätning för att få en så homogen suspension som möjligt till varje flaska.

Vid mätning av nitrathalten togs 0,2 cm<sup>3</sup> vatten från varje flaska och överfördes till en LCK 340 kyvett (Bilaga 3). Till kyvetten sattes också 1 cm<sup>3</sup> reagens varefter den skakades om och fick stå i 15 minuter för att nå jämvikt. Sedan placerades kyvetten i en spektrofotometer för mätning av nitrathalten. Nitrathalten i samtliga duranflaskor mättes med 24 timmars intervall under de åtta första dagarna. Därefter utökades mätintervall till var tredje dag fram till dag 19 då försöket avslutades.

## RESULTAT

Delförsök 1 visade att det går att skapa syrefritt vatten vilket var en förutsättning för att kunna genomföra huvudexperimentet. I delförsök 2 påvisades att det finns en denitrifikationspotential i sedimentet vilket även det var en förutsättning för att kunna genomföra huvudexperimentet. Delförsök 3 visade att systemet fungerade bra och att inget material eller parametrar behövde justeras inför huvudexperimentet, trots detta justerades nitrathalten i flaskorna ner i huvudexperimentet till hälften för att slippa späda proven inför analysen.

### Delförsök 1 - Syrefritt vatten

Resultatet från delförsök 1 visade näst intill syrefria förhållanden i vattnet i duranflaskorna. I samtliga flaskor låg syrehalten vid tre upprepade mätningar under 0,1 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup> (Tabell 3). Medelvärde var 0,037 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup> och standardavvikelsen 0,025.

*Tabell 3. Resultat från mätning av syrehalten (mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>) i vatten*

Mätning	Flaska 1	Flaska 2	Flaska 3	Flaska 4	Flaska 5
Mätning 1	0,00	0,05	0,01	0,08	0,05
Mätning 2	0,01	0,06	0,01	0,06	0,04
Mätning 3	0,01	0,07	0,02	0,05	0,04

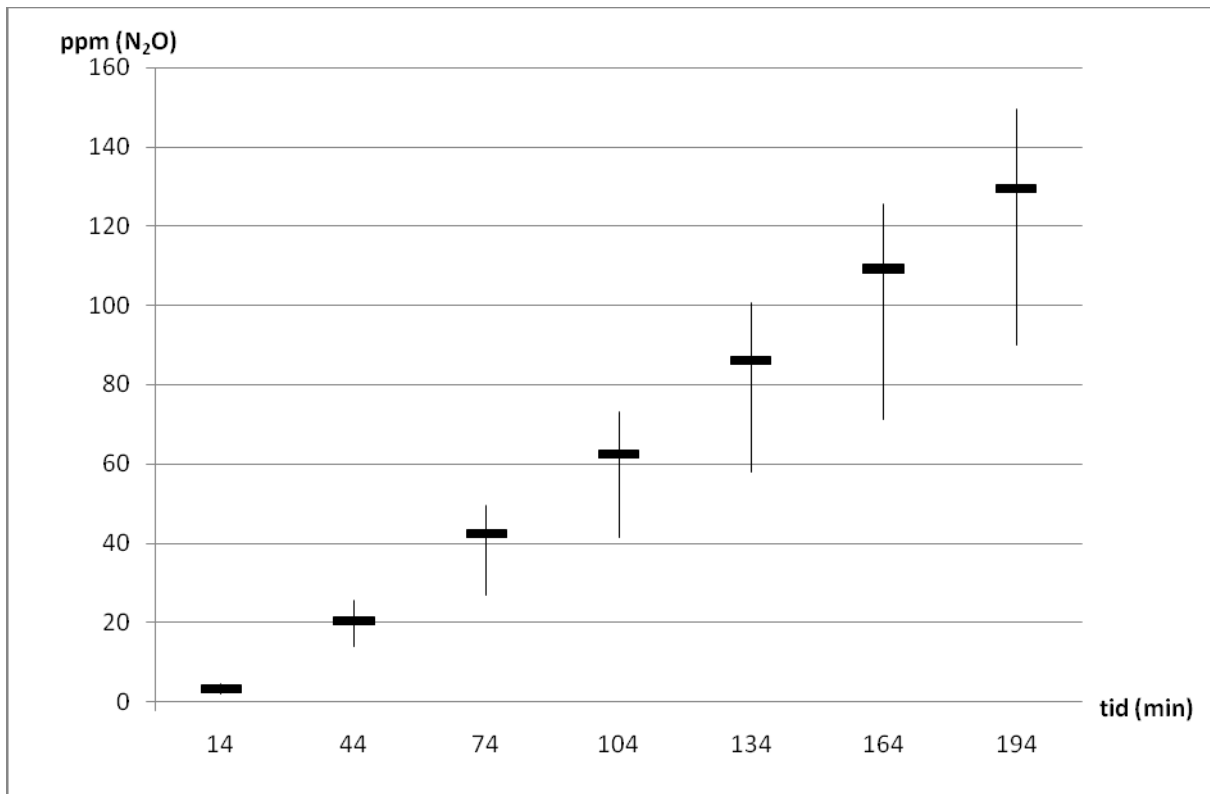
### Delförsök 2 – Denitrifikationspotential (PDA)

I den använda sedimentsuspensionen var pH 7,45 och torrvikten 0,315 g ts/g.

Lustgashalten i flaskorna ökade markant över tiden vilket visar att sedimentet innehåller gott om levande denitrifikationsbakterier (Fig. 4), detta trots att den tillsatta glukoshalten varierade från 0-1 mM i flaskorna. Ökningen av lustgasen följde kurvan för en linjär funktion.



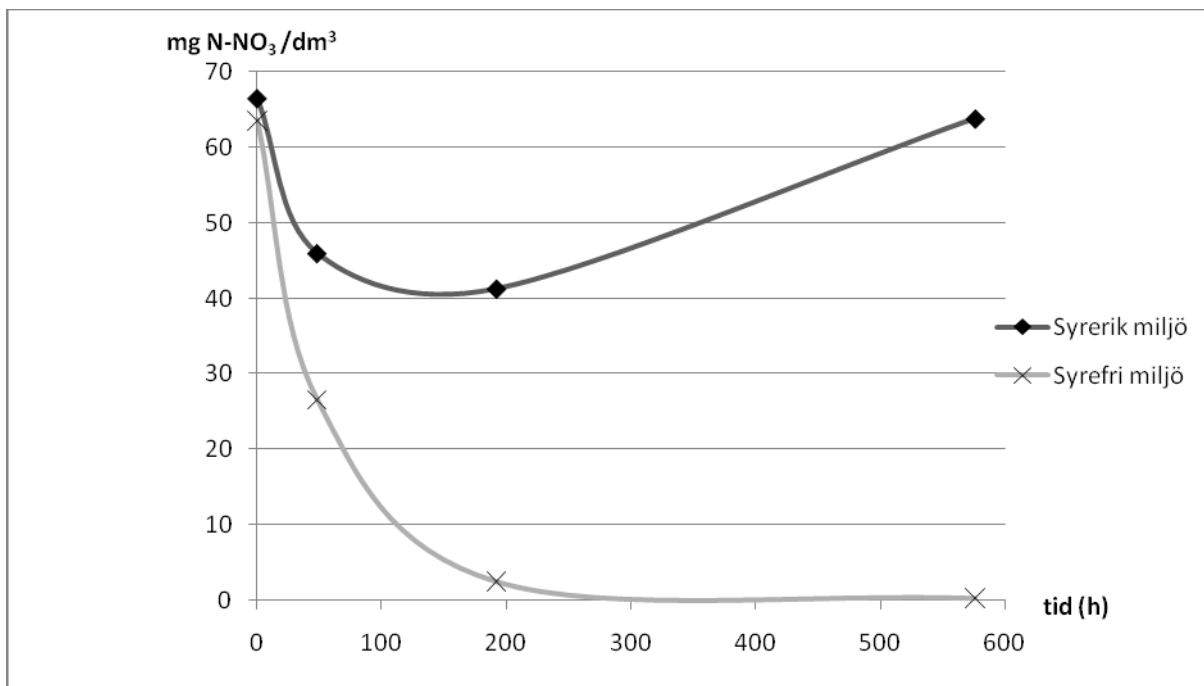
Skillnaden mellan flaskornas standardavvikelse ökar med tiden (Fig. 4). Hastigheten av lustgasproduktionen beräknades till  $0,09 \text{ ppm N}_2\text{O min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ ts}$  (uträkning i Bilaga 1).



Figur 4. Denitrifikationspotentialen (PDA) hos sedimentet (medelvärden  $\pm$  standardavvikelse,  $n=9$ ).

### Delförsök 3 – Test av parametrar och inställningar

Delförsök 3 visade att nitrathalten i den syrerika miljön på sikt stabiliseras i närheten av den ursprungliga nivån, medan den i den syrefattiga miljön sjunker till nära noll (Fig. 5). Resultatet tyder på att systemet fungerar.



Figur 5. Kvävehaltens variation i vatten över tiden i syrerik respektive syrefri miljö (n=1).

### Huvudexperimentet

Efter autoklaveringen var syrehalten låg i samtliga duranflaskor, medelvärdet var 27,5, med en spridning från 22,1 till 31,5 mg NO<sub>3</sub>-N/dm<sup>3</sup> (Tabell 4).

Tabell 4. Syrehalt och nitrathalt i vattnet vid start av huvudexperimentet

Duranflaska	O <sub>2</sub> halt mg/dm <sup>3</sup>	NO <sub>3</sub> -N mg/dm <sup>3</sup>
1	0,08	26,6
2	0,13	30,2
3	0,07	26,2
4	0,07	29,4
5	0,18	29,6
6	0,05	25,8
7	0,05	25,9
8	0,06	31,5
9	0,13	22,1
10	0,06	29,5
11	0,05	23,8
12	0,05	26,4
13	0,05	31,1
14	0,04	27,0
15	0,06	26,0
16	0,04	29,3

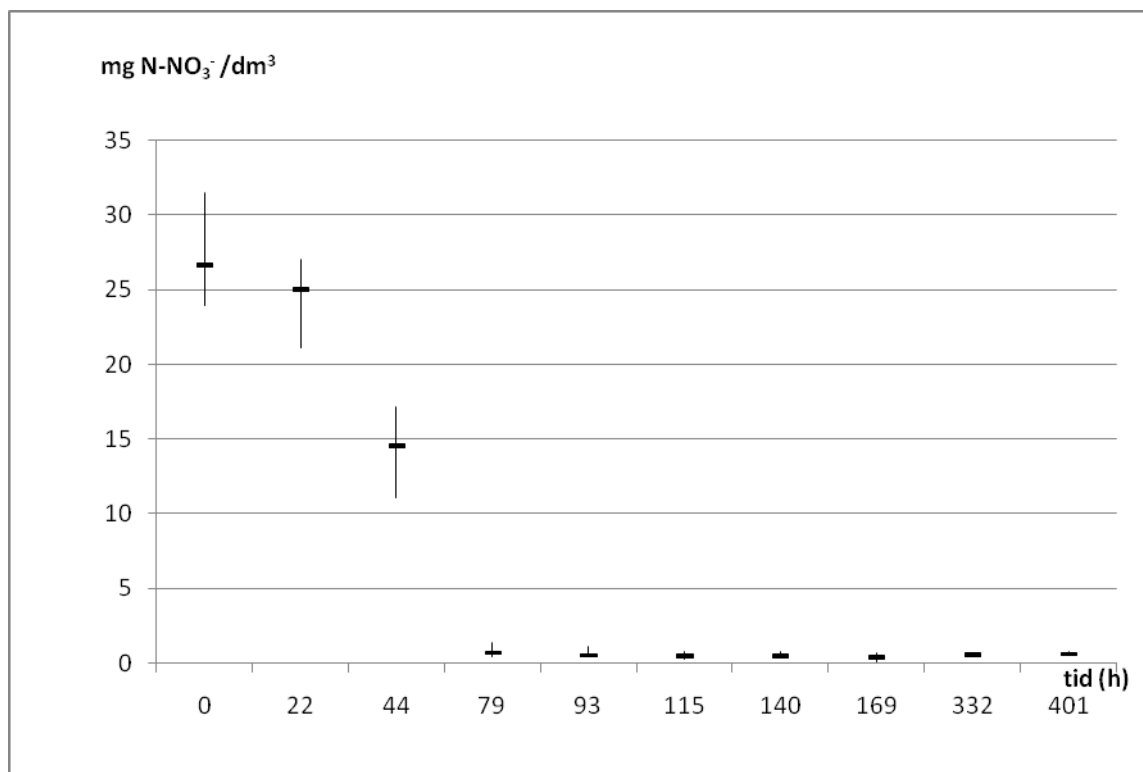
Syrets löslighet i vatten var helt beroende av vattnets temperatur (Tabell 5). Efter ca 20 min hade temperaturen i vattnet sjunkit till 25°C och då stod vattnets temperatur i jämvikt med luftens temperatur och syrehalten var 7,59 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>.

Tabell 5. Tid till jämvikt från syrereducerande förhållande till syremättade förhållande efter autoklavering

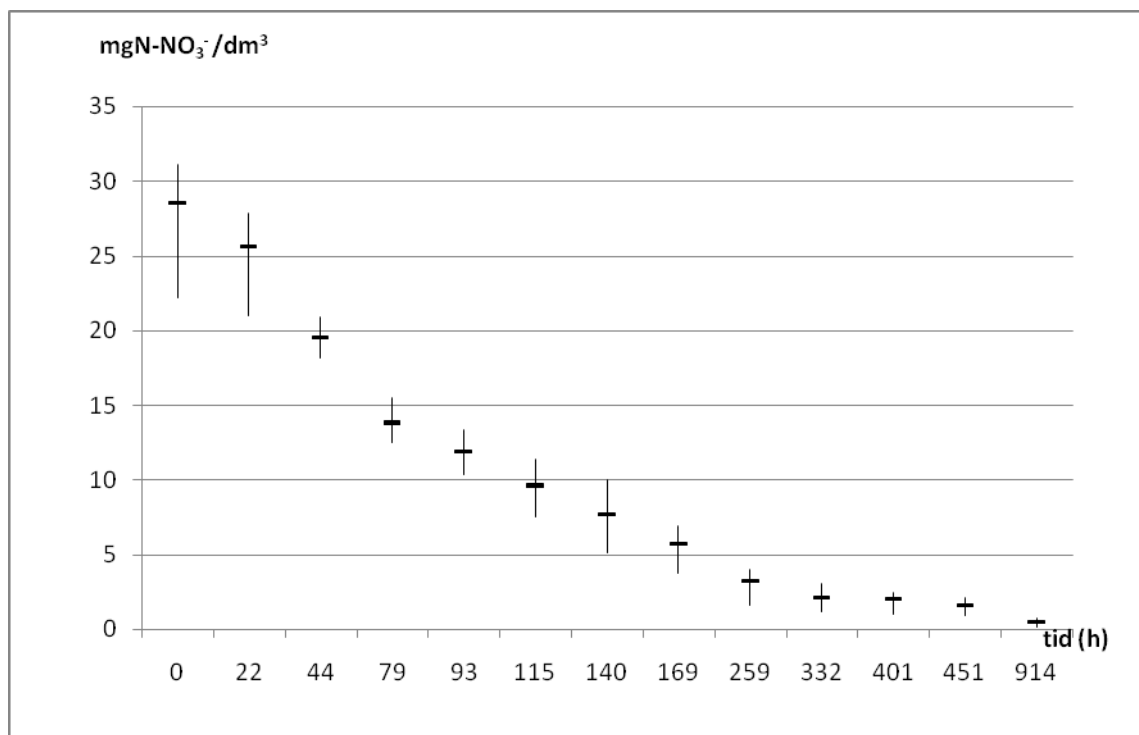
Temp °C	mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup> H <sub>2</sub> O	Tid(min)
>50	3,78	5
46	5,53	8
37	5,61	10
34	5,84	12
30	6,29	14
25	7,59	18

Den negativa kontrollen som inte innehöll något sediment hade en uppmätt koncentration på 29,3 mg NO<sub>3</sub>-N/dm<sup>3</sup> efter 425 h.

I de flaskor som hade en syrefattig miljö minskade nitrathalten under de 79 första timmarna för att sedan ligga konstant (Fig. 6). Nitrathalten minskade under hela försökstiden även i flaskorna med syrerik miljö (Fig. 7).



Figur 6. Nitrathalten minskar över tiden i syrefri miljö (medelvärden ± standardavvikelse; n=8).



Figur 7. Nitrathalten minskar över tiden i syrerik miljö (medelvärden  $\pm$  standardavvikelse;  $n=8$ ).

Uppmätta syrehalter och pH i flaskorna när försöket avslutades efter 19 dagar visas i Tabell 6.

Tabell 6. Uppmätta syrehalter i duranflaskorna efter att försöket avslutats

Flasknummer	Syrestatus	mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup>	pH
15	Låg	1,38	8,98
11	Låg	0,59	9,00
14	Låg	0,53	9,02
7	Låg	0,33	8,94
3	Låg	0,37	8,95
8	Låg	2,14	8,97
6	Låg	0,98	8,97
12	Låg	0,52	9,04
<b>Medel</b>		<b>0,85</b>	<b>8,89</b>
9	Hög	9,08	8,08
2	Hög	9,08	8,11
1	Hög	9,06	8,09
16	Hög	9,05	8,10
10	Hög	9,03	8,07
5	Hög	9,00	8,10
4	Hög	9,00	7,98
13	Hög	9,01	8,05
<b>Medel</b>		<b>9,03</b>	<b>8,07</b>
<b>t-test</b>		<b>3,08 x 10<sup>-9</sup></b>	

I Tabell 6 ser man en skillnad mellan leden i syrehalt, skillnaden är signifikant. De första åtta flaskorna ingick i det syrefattiga ledet och i dessa uppmättes en låg syrehalt jämfört med de övriga åtta som hade en hög syrehalt. Vad gäller pH har alla flaskorna fått högre pH än vad de

hade från början, vilket var 7,45. pH-ökningen är en indikation på denitrifikation. Den negativa kontrollen som inte innehöll något sediment hade en uppmätt koncentration på 29,3 mg NO<sub>3</sub>-N/dm<sup>3</sup> efter 425 h.

## DISKUSSION

Huvudexperimentet visade att det fanns en skillnad mellan den syrerika och den syrefattiga miljön med avseende på nitratkoncentrationens minskning. Minskningen gick fortare i den syrefria miljön, vilket kan vara ett tecken på att denitrifikationen gick fortare där. På 79 h hade nitrathalten sjunkit till nära noll i den syrefattiga miljön medan den i den syrerika miljön vid samma tidpunkt hade halverats från cirka 28 mg NO<sub>3</sub>-N/dm<sup>3</sup> till cirka 14 mg NO<sub>3</sub>-N/dm<sup>3</sup>. Om man jämför huvudexperimentet med delförsök 3 är den stora skillnaden att nitrathalten i den syrerika miljön återgick och hamnade nära den ursprungliga nivån i delförsök 3.

Jag lyckades med att skapa syrereducerade förhållanden i duranflaskorna vilket var en utgångspunkt för att kunna göra en jämförelse mellan en syrerik och en syrefattig miljö. Enligt Jesper Olsson på Uppsala kommun sker denitrifikationen om syrehalten är under 0,5 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>. De syrefattiga flaskorna i försöket hade alla en syrenivå under denna, medan de syresatta flaskorna hade en syrehalt klart över detta värde. Jag påvisade också en denitrifikationspotential i sedimentet vilket visar att det använda sedimentet hade en god population av aktiva denitrifikationsbakterier eller som aktiverades under försöksbetingelserna. Ett sediment med aktiva bakterier var en förutsättning för att kunna genomföra försöket.

Resultatet från delförsök 3 ger en antydning om att man skulle kunna bevara nitrat genom att hålla en hög syrehalt i vattnet. Nitrathalten sjönk till att börja med i både den syrerika och den syrefattiga miljön, men vände sedan och började öka igen i den syrerika miljön efter cirka 100 timmar. Att nitrathalten sjönk temporärt i den syrerika miljön kan bero på att nitraten immobiliserades i bakterier som lever i sedimentet. Att nitrathalten sedan ökade igen kan ha sin förklaring i att bakterierna som hade immobiliserat nitraten dog och kvävet mineraliserades till ammonium och sedan vidare till nitrat igen. Det skulle också kunna vara så att mineralisering av sedimentets organiska material kommer igång tidigt men att detta inte syns förrän nitrifikationsbakterierna lyckats växa till. I den syrefria miljön är det rimligt att anta att minskningen av nitraten beror på denitrifikation utförd av bakterierna i sedimentet.

Trenden som jag kunde se i delförsök 3 upprepades inte i huvudexperimentet, där kunde man inte se någon antydning om att nitrat skulle kunna bevaras helt genom att hålla en hög syrehalt i vattnet.

En skillnad mellan delförsök 3 och huvudexperimentet var att nitrathalten var dubbelt så hög i delförsök 3 (65 mg N-NO<sub>3</sub>/dm<sup>3</sup>) vid försökets start jämfört med i huvudexperimentet (30 mg N-NO<sub>3</sub>/dm<sup>3</sup>). I verkligheten varierade nitrathalten mellan duranflaskorna, i huvudexperimentet låg nitrathalten mellan 22,1-31,5 mg N-NO<sub>3</sub>/dm<sup>3</sup>. Anledningen till att nitrathalten sänktes i huvudexperimentet jämfört med delförsök 3 var halten skulle hamna inom mätintervallet för reagenstestet som användes vid mätningen nitrathalten. Mätintervallet låg mellan 5-30 mg NO<sub>3</sub>-N/dm<sup>3</sup>. Rimliga värden på nitrathalten i dräneringsvatten är 15-30 mg NO<sub>3</sub>-N/dm<sup>3</sup> (Johansson & Gustafson, 2008). Att nitrathalten från början skiljde sig mellan de båda försöken kan vara en del av orsaken till att delförsök 3 och huvudexperimentet inte gav samma resultat. I huvudexperimentet där nitrathalten var 30 mg NO<sub>3</sub>-N/dm<sup>3</sup> från början

kan nitraten ha blivit det begränsande tillväxtämnet för bakterierna. Procentuellt sett har bakterierna haft mer glukos i förhållande till kväve att leva av vilket gör att de kunde hålla sig vid liv under längre tid. Om så vore fallet skulle en ökning av nitrathalten kunna ha observerats om mätningarna fortsatt när bakterierna fick slut på glukos och dog.

I den negativa kontrollen hade nitrathalten inte minskat något under försökets gång. Det visar att minskningen av nitrathalten i de övriga flaskorna var associerat till sedimentet och då mest sannolikt till dess denitrifikationsförmåga.

Den sedimentsuspension på 100 cm<sup>3</sup> som användes i försöksflaskorna innehöll 14 g ts. Detta motsvarar 1,55 viktprocent eller 11,1 volymprocent. Att mängden sediment är så stor i förhållande till vattenvolymen medförde en stor total partikelyte i sedimentet som kunde användas av mikroorganismer. I naturliga vattendrag lever denitrifikationsbakterierna av nitrat som diffunderar ner i sedimentet vilket leder till att hela bottenprofilen inte kan utnyttjas av denitrifikationsbakterierna. I mitt experiment kunde bakterierna använda hela sedimentvolymen i duranflaskorna. Detta kan också medföra en hög respirationshastighet av syre varvid syrefria mikromiljöer i sedimentet kunde utvecklas där denitrifikation kan äga rum. Det kan vara en av förklaringarna till att nitrathalten sjönk även i de flaskor som hade en syrerik miljö.

Något som talar emot att denitrifikation har skett i den syrerika miljön är det faktum att denitrifikationen normalt inte sker förrän syrehalten är lägre än 0,5 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>. Att det skulle bildas nästintill syrefria miljöer med en syrehalt under 0,5 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup> då syrekoncentrationen i flaskan ligger runt 9 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup> kan verka mindre sannolikt. I naturen skulle det dock kunna ske, till exempel inne i aggregat av lerkoloider i sedimentet.

I det syrerika ledet ökade pH med 0,5 enheter och i den syrefattiga miljön med 1,5 enheter. pH-ökningen är troligen en effekt av att denitrifikation har ägt rum. Skillnaden i pH tyder då på att det har skett mer denitrifikation i det syrefattiga ledet eftersom pH ha ökat mer där. Nitraten har dock minskat till samma nivå i båda leden vilket borde ha gett samma ökning i pH. För att kunna påvisa att denitrifikation har ägt rum i den syrerika miljön borde pH ha varit lika i båda leden vid experimentets slut. Att pH var olika i de båda leden vid försökets slut styrker min teori om att nitraten fortfarande var immobiliserad i bakterier i den syrerika miljön då försöket avslutades. Teoretiskt sett borde det inte ske någon denitrifikation i den syrerika miljön eftersom syrehalten är högre än 2 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup> (Olsson, 2008-11-11, pers. med.). Höjningen av pH som skedde i den syrerika miljön kan bero på andra pH-höjande processer.

Det skulle vara intressant att titta på vilka former av nitraten som bildas i vattnet, genom att mäta mängden kvävemoxid, lustgas eller kvävgas som avgår ifrån duranflaskan och se om det finns något samband mellan syrehalt och kvävegaseras sammansättning och avgång. Detta skulle också vara intressant ur klimatsynpunkt ifall det bildas växthusgaser. Det vore också intressant att mäta "Dissolved Organic Carbon" (DOC) och den totala kolhalten i sedimentet. Då skulle man kunna se hur mycket organiskt material som finns att utnyttja för mikroorganismerna.

Jag ser personligen i framtiden ett slutet system där dräneringsvatten återcirkuleras till jordbruksmarken via bevattningsdammar. För att bevara nitraten i vattnet bör man undvika sediment i dammarna, det skulle till exempel kunna samlas upp i ett kalkfilter innan vattnet leds till bevattningsdammen. Denitrifikationen missgynnas av hög syrehalt i vattnet och man

skulle därför kunna syresätta dammarna med hjälp av luftpumpar som gör att vattnet hela tiden cirkuleras i dammen och på så vis syresätts via diffusion från luften. Med stigande kvävepriser och ökad produktion som en följd av bevattning skulle ett system där dräneringsvattnet återcirkuleras kunna bli kostnadseffektivt. På grund av övergödningproblematiken i Östersjön kan man också tänka sig att lantbrukare som genomför denna typ av återcirkulation får extra ekonomiskt miljöstöd eftersom de minskar näringsbelastningen på våra vattenmiljöer där dräneringsvattnet annars skulle hamna. Vattendirektivet från EU som har målsättningen att alla vattendrag ska ha god ekologisk status skulle också kunna utgöra ett incitament för extra miljöstöd, likaså Baltic Sea Action Plan som har syftet att minska övergödningen i Östersjön (Naturvårdsverket, 2008).

## **Slutsatser**

Med utgångspunkt från resultatet från mitt huvudexperiment kan man inte dra några säkra slutsatser om att man kan bevara nitrat i vatten genom att hålla en hög syrehalt i vattnet, detta eftersom nitrathalten i huvudexperimentet sjönk över tiden i såväl den syrefattiga miljön som i den syrerika. Resultatet från delförsök 3 visar dock att min hypotes inte helt bör avfärdas. Det skulle kunna vara så att de mikrobiella samhällena i flasksystemen har utvecklats helt olika. I den syrefattiga miljön har vi denitrifikation och i den syrerika miljön pågår immobilisering av biomassa alternativt mineralisering till nitrifikation.

## **TACK**

Tack till de personer som har hjälp till så att jag har kunnat genomföra mitt examensarbete, Ingrid Wesström, Mikael Pell, Anna Mårtenson, Abraham Joel, Ingemar Persson, Gunilla Hallberg, Anne Olsson, Jesper Olsson, Kristina Lindström, samt alla andra personer som har hjälpt mig fram i mitt arbete.

Dennis Wiström  
Uppsala 2009-07-12



## REFRENSER

- Brainwood, M.A., Burgin, S. and Maheshwari, B. 2004. Temporal variation in water quality of farm dams: impacts of land use and water sources. *Agricultural Water Management* 70:151-175.
- Burt, T.P., Heathwaite, A.L. and Trudgill, S.T. 1993. *Nitrate Processes, Patterns and Management*. John Wiley and Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England. ISBN 0-471-93476-3.
- Ekblom, L., Larsson, S., Bergström, L., Ölme, A., Jönsson, U., Lillieborg, S. and Krigsman, T. 2003. *Tabeller och formler för NV och TE programmen femte upplagan*. Författarna och Liber AB, 11398 Stockholm. ISBN 91-47-01746-5.
- Jansson, M., Leonardsson, L. and Henriksson, J. 1991. *Kväveretention och denitrifikation i jordbrukslandskapets rinnande vatten*. Naturvårdsverket. Rapport 3901.
- Johansson G. and Gustafson, A. 2008, *Observationsfält på åkermark, Avrinning och växtnäringsförluster för det agrohydrologiska året 2006/07 samt en långtidsöversikt teknisk rapport 121*.
- Henriksson, A. 2000, *Kemi Glerups utbildning AB*. ISBN 91-40-63354-3.
- Lindkvist H. 1993. *Våtmarker som kvävefälla. Fakta. Mark/växter Nr 2*. ISSN 0280-7149. Naturvårdsverket, 2008. *Sveriges åtagande i Baltic Sea Action Plan, Förslag till nationell åtgärdsplan*.
- Pettersson, K. and Boström, B. 1990. *Kväveomsättning i limniska ekosystem. En litteraturöversikt*. Statens Naturvårdsverk, Rapport 3822.
- Silberberg, M. 2006. *Chemistry The Molecular Nature of matter and change fourth edition* McGraw-Hill. ISBN 0-07-111658-3.
- Sörensen, J., Nielsen, L.P., Christensen, P.B. and Revsbech, N.P. 1990. *Denitrifikation og iltomsætning i vandløbssedimenter*. NPo-forskning fra Miljøstyrelsen, nr C2. Strndgarde 29 1401 Köpenhamn K. ISBN:87-503-8360-4.

### Personligt meddelande

- Jesper Olsson. Uppsala kommun. Driftingenjör på Kungsängens reningsverk. [2008-11-11] (tfn 018-727 42 19).
- Mikael Pell. Institutionen för mikrobiologi, Sveriges lantbruksuniversitet (SLU). Uppsala [2009-01-12].

## Bilaga 1. Beräkningar

### Beräkning av nitrathalt i det syntetiska dammvattnet

$$\text{KNO}_3 \text{ 22,025g/dm}^3$$

$$\text{KNO}_3=101\text{g/mol, N}=14\text{g/mol} \rightarrow 62/101=0,13861386$$

$$\text{N} = 0,138613 * 22,025\text{g}=3,0529\text{g/dm}^3$$

$$3,0529\text{g/dm}^3=3,0529\text{ g}_\text{N}/1000\text{ cm}^3_{\text{H}_2\text{O}}=0,0030529\text{ g}_\text{N}/\text{cm}^3_{\text{H}_2\text{O}}$$

$$0,003050529\text{g}_\text{N}/\text{cm}^3_{\text{H}_2\text{O}} * 9\text{ cm}^3=0,0274767\text{g}_\text{N}/909\text{ cm}^3_{\text{H}_2\text{O}} \rightarrow 30,227\text{mgN/dm}^3$$

### Beräkning av glukos halt i det syntetiska dammvattnet

$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6, 30,013\text{g}(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)/1000\text{ cm}^3\text{ H}_2\text{O} = 0,030013\text{g}/\text{cm}^3$$

$$0,030013\text{g}/\text{cm}^3 * 4\text{ cm}^3 = 0,120052\text{g}$$

$$4\text{ cm}^3+900\text{ cm}^3 = 904\text{ cm}^3$$

$$0,120052\text{g}/904\text{ cm}^3=0,1328\text{mg}$$

$$0,1328\text{mg}/904\text{ cm}^3 = 0,1469\text{mg/dm}^3$$

### Beräkning av negativ kontroll

$$\text{KNO}_3^- \text{ 101g/mol tillsatt mängd } 0,303\text{g KNO}_3^- /\text{dm}^3$$

$$0,303\text{g}/101\text{g/mol}=0,003\text{mol}$$

$$\text{N}=14\text{g/mol}$$

$$14\text{g/mol} * 0,003\text{mol}=0,042\text{g}=42\text{mg N-NO}_3^-$$

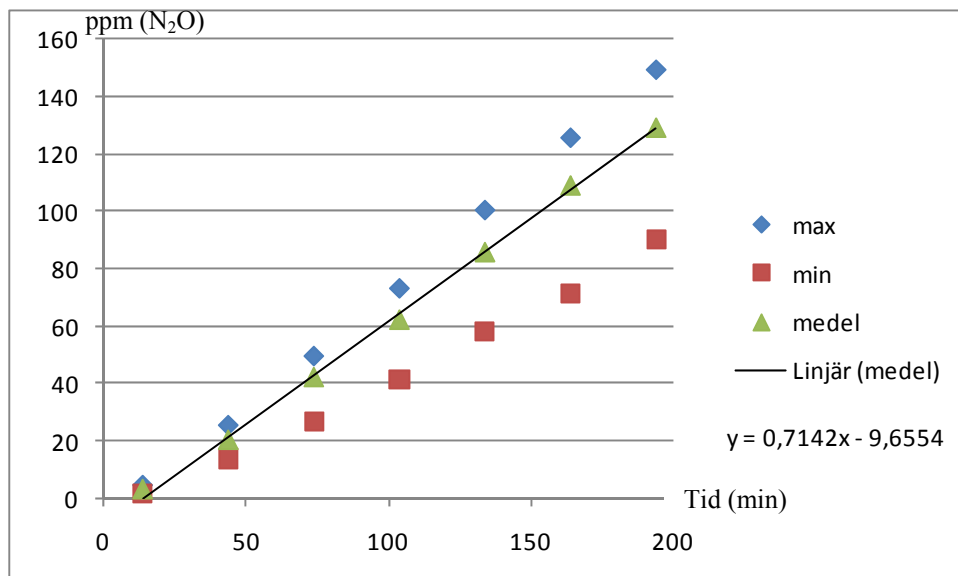
### Beräkning av PDA i sedimentet

Totala försöket innehåller 3,2 g ts och medelhastigheten är 0,7 ppm N<sub>2</sub>O/min.

$$10\text{ g} = 3,2\text{ g ts}$$

$$25\text{ g} = 8\text{ g ts}$$

$$0,7\text{ ppm N}_2\text{O/min} / 8\text{ g ts} = 0,09\text{ ppm N}_2\text{O/min} * \text{g ts}$$



## Bilaga 2. Spädningsserier till gaskromatografen

### Koncentration N<sub>2</sub>O i standardserie

Standarserie	ppm
S1	0,717
S2	3,57
S3	10,6
S4	17,8
S5	35,5
S6	70,6
S7	105,5
S8	157,6
S9	209,2
S10	277,8
S11	345,8

### Beredning av kalibreringsgaser för standarserie

Jag tog mina 118 cm<sup>3</sup> P-flaskor som innehöll ren N<sub>2</sub> och använde mig av hamiltonsprutor för att applicera ren N<sub>2</sub>O till varje 118 cm<sup>3</sup> flaska. Tabell 3 nedan visar hur spädningen gick till.

Tabell 3. Spädningsserie och kalibreringsgaser för standardserien

cm <sup>3</sup> N <sub>2</sub> O till 118 cm <sup>3</sup> flaska	0,1	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
ppm i 118 cm <sup>3</sup> flaska 1	846,7	4219,4	8403,4	12552	16667	20747
cm <sup>3</sup> gas till ny 118 cm <sup>3</sup> flaska 2	0,1	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Standardserie	0,717	3,57		10,6		
ppm (småampuller)	S1	S2		S3		
		17,8	35,5			
		S4	S5			
			70,6	105,5		
			S6	S7		
				157,6	209,2	
				S8	S9	
					277,8	345,8
					S10	S11

### Bilaga 3. Information om Spektrofotometern och analysinstrument

#### Laborationsutrustning

Kyvetter med reagens till f användes LCK 339,340 för att mäta nitrathalten.

LCK339 kemiskbenämning

EG-Nr. CAS-Nr. Kemiskt namn Mängd/halt Klassificering

231-791-2 7732-18-5 Vatten >75 %

200-661-7 67-63-0 2-propanol, isopropanol, propan-2-ol >20 % F, Xi R11-36-67

209-400-1 576-26-1 2,6-xylenol <1 % T, C, N R24/25-34-51-53

204-662-3 123-92-2 3-metylbutylacetat, isopentylacetat <1 % R10-66

Mer info på hach-langs hemsida.

<http://www.hach->

[lange.fr/shop/action\\_q/download%3Bmsds/msds\\_document/sv%252FLCK339%252Epdf/lkz/FR/spkz/fr/TOKEN/wWZ-gTw72TkohGnDUQJzXsLMi8o/M/Hq\\_PuA](http://www.hach-lange.fr/shop/action_q/download%3Bmsds/msds_document/sv%252FLCK339%252Epdf/lkz/FR/spkz/fr/TOKEN/wWZ-gTw72TkohGnDUQJzXsLMi8o/M/Hq_PuA)

LCK 340 kemiskbenämning

EC-No. CAS-No. Chemical name Quantity Classification

231-791-2 7732-18-5 Water >95 %

200-661-7 67-63-0 isopropanol, isopropyl alcohol, <5 % F, Xi R11-36-67 propan-2-ol

209-400-1 576-26-1 2,6-xylenol <1 % T, C, N R24/25-34-51-53

204-662-3 123-92-2 isopentyl acetate <1 % R10-66

Jag använde mig av DR 5000 UV-VIS Spectrophotometer för att analysera kyvetterna LCK 339 och LCK340

Spektrofotometer är ett optiskt instrument för mätning av absorptionen av ljus av given våglängd i färgade lösningar. Man kan beräkna koncentrationen av det färgade ämnet i lösningen med av adsorptionen och beerslag. För mer information se produktens hemsida.

<http://shop.hach->

[lange.com/shop/action\\_q/download%3Bdocument/DOK\\_ID/12201/type/pdf/lkz/II/spkz/en/TOKEN/\\_TpiE08bGrLtjQ4a2OHY0Wh7ugc/M/UJl1Gw/DOC032.52.00432.Sep07.web.pdf](http://shop.hach-lange.com/shop/action_q/download%3Bdocument/DOK_ID/12201/type/pdf/lkz/II/spkz/en/TOKEN/_TpiE08bGrLtjQ4a2OHY0Wh7ugc/M/UJl1Gw/DOC032.52.00432.Sep07.web.pdf)

LCK reagens

<http://www.hach->

[lange.fr/shop/action\\_q/download%3Bmsds/msds\\_document/sv%252FLCK339%252Epdf/lkz/FR/spkz/fr/TOKEN/wWZ-gTw72TkohGnDUQJzXsLMi8o/M/Hq\\_PuA](http://www.hach-lange.fr/shop/action_q/download%3Bmsds/msds_document/sv%252FLCK339%252Epdf/lkz/FR/spkz/fr/TOKEN/wWZ-gTw72TkohGnDUQJzXsLMi8o/M/Hq_PuA) 2009-01-13