



UNDERSØGELSE AF VÆGTTAB VED ALKOHOLKONSERVERING AF BUNDFAUNA

Teknisk rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi

nr. 71

2015



AARHUS
UNIVERSITET

DCE - NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

[Tom side]

UNDERSØGELSE AF VÆGTTAB VED ALKOHOLKONSERVERING AF BUNDFAUNA

Teknisk rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

nr. 71

2015

Jørgen L.S. Hansen
Henrik Fossing

Aarhus Universitet, Institut for Bioscience



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Datablad

Serietitel og nummer:	Teknisk rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 71
Titel:	Undersøgelse af vægttab ved alkoholkonservering af bundfauna
Forfattere:	Jørgen L.S. Hansen & Henrik Fossing
Institution:	Aarhus Universitet, Institut for Bioscience
Udgiver:	Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi ©
URL:	http://dce.au.dk
Udgivelsesår:	December 2015
Redaktion afsluttet:	december 2015
Sproglig kvalitetssikring:	Charlotte Hviid
Faglig kommentering:	Martin Larsen
Kvalitetssikring, DCE:	Poul Nordemann Jensen
Finansiel støtte:	Naturstyrelsen
Bedes citeret:	Hansen, J.L.S. & Fossing, H. 2015. Undersøgelse af vægttab ved alkoholkonservering af bundfauna. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 24 s. - Teknisk rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 71 http://dce2.au.dk/pub/TR71.pdf
	Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse
Sammenfatning:	I 2014-2015 gennemførte Det Marine FagDataCenter på foranledning af Naturstyrelsen undersøgelser af alkoholkonservering af bundfauna, for at afklare, hvor stort et vægttab, der forekommer i det konserverede materiale, og hvordan det afhænger af opbevaringsperioden. Der blev opsat 36 forsøg med 4 forskellige dyrerækker med 16 slægter af bunddyr. Dyrene blev konserveret i 70 % alkohol og vægttabet blev fulgt over 460 dage. Resultatet viste, at der efter det første vægttab indenfor et (til få) døgn efter konserveringen foregik et eksponentielt vægttab af dele af dyrenes biomasse med en gennemsnitlig rate på ca. 2,8 % om dagen (median 1,6 %). Forløbet af vægttabet kan beskrives med to labile og en stabil pulje af biomassen. I forbindelse med konserveringen skete der et hurtigt vægttab indenfor et (til få) døgn på 2-37 % (gennemsnit 15 %), som kan forklares med dræning af vand fra dyrenes væv. Herefter kan vægttabet beskrives med en generel model, der beskriver et eksponentielt vægttab mod en stabil biomasse. Modellerede parametre beskriver dels den alkohol-labile pulje af biomassen og den tilknyttede henfaldsrate samt den stabile pulje. Den alkohol-opløselige pulje varierede fra 5 til 80 % procent. Den samlede reduktion af biomassen, der sker som følge af alkoholkonserveringen, er op til en faktor 5. Den alkoholopløselige pulje afhænger af det taxonomiske tilhørsforhold. Skalbærende bløddyr og pighuder har en mindre alkoholopløselig pulje. På baggrund af forsøget kan det afvises, at biomassevægten er stabil efter 3 måneders opbevaring. Efter 3 måneders opbevaring kan der forventes en yderligere reduktion i vægten med ca. 18 % for havbørsteorme og ca. 10 % for alle grupper samlet. Hvis den maksimale opbevaringstid øges fra 6 til 12 måneder reduceres biomassen yderligere med i gennemsnit 7 % for havbørsteorme og 1-3 % for de øvrige dyrrækker. Hvis gældende praksis ændres fra 12 til 6 måneders opbevaring, vil metodeskiftet betyde en vægtforøgelse på op til ca. 13 % for børsteormene og ca. 2-3 % for de øvrige dyregrupper. Hvis der anvendes askefri tørvægt, forventes den relative vægtændring for bløddyrene, at ligge tættere på den der blev observeret for børsteormene.
Emneord:	Bundfauna, alkoholfiksering, overvågning, NOVANA, Tekniske anvisninger
Layout:	Karin Balle Madsen
Foto forside:	Guldmus (<i>Aphrodita aculeata</i>) før konservering. Foto: Jørgen L.S. Hansen
ISBN:	978-87-7156-182-1
ISSN (elektronisk):	2244-999X
Sideantal:	24
Internetversion:	Rapporten er tilgængelig i elektronisk format (pdf) som http://dce2.au.dk/pub/TR71.pdf

Indhold

1	Baggrund	5
2	Metoder	7
3	Resultater og diskussion	9
3.1	Vægtændringer	9
3.2	Model for vægtreduktion ved alkoholfiksering	10
3.3	Konsekvenser af opbevaringens varighed for biomassebestemmelsen af bundfaunaprøver	15
4	Konklusion	18
5	Litteratur	19
6	Appendix 1: Vejetal for forsøg 1-36 udført 2014-2015	20
7	Appendix 2: Beregnet vægttab ved alkoholkonservering i perioderne 0-1 dag, 1-90 dage, 90-180 dage, 180-365 dage og efter 365 dage	23

[Tom side]

1 Baggrund

Undersøgelser af marin blødbundsfauna er en vigtig parameter i den danske overvågning af havmiljøet iht. Vandramme- og Havstrategidirektiverne. Vandrammedirektivet foreskriver, at den benthiske invertebratfaunas sammensætning og tæthed skal undersøges, og i Havstrategidirektivet udvides disse undersøgelser med måling af biomassen. Undersøgelserne omfatter artsspecifik tæthed og biomasse, hvor sidstnævnte bestemmes efter, at prøvematerialet forudgående har været fikseret i 70 % alkohol i kortere eller længere tid.

Formålet med biomassebestemmelsen er naturligvis at få et vægtmål, der ligger så tæt på vægten af det levende dyr som muligt. Herudover er det nødvendigt, at kunne sammenligne biomassemaal fra den ene undersøgelse til den anden. Men hvad enten vægten bestemmes som vådvægt, tørvægt, askefri tørvægt (AFDW) eller kulstofvægt, så vil fikseringen påvirke vægten af det biologiske materiale. Når fikseringsmidlet trænger ind i det biologiske væv, vil vandindholdet i vævet og dermed vådvægten af materialet ændre sig. Herudover vil ethanol til en vis grad også opløse nogle af de organiske forbindelser (fx fedtstoffer). For kvaliteten og tolkningen af biomasseopgørelserne af bundfaunaen er det nødvendigt, at vide hvor store vægtændringer der kan forventes, og om der er et fast forhold mellem vægten før og efter konservering eller om effekten af konservering varierer fra dyr til dyr. Hvis vægtændringen varierer, vil det endvidere være væsentligt at kende årsagen til denne variation, så fejlkilder kan imødegås.

I forbindelse med udarbejdelsen af de tekniske anvisninger for blødbundsfaunaundersøgelser i regi af NOVANA har Naturstyrelsen bedt Det Marine FagDataCenter om at vurdere eventuelle fejlkilder ved at forlænge den tid der må gå, fra at bundfaunaoprøven tages og til biomassen bestemmes. HELCOM anbefaler, at biomassen i bundfaunaoprøver først analyseres efter 3 måneders opbevaring i 70 % alkohol.

Et studie af Wetzel m.fl. (2005) har imidlertid vist, at 2 slægter af krebsdyr (*Corphium* og *Gammarus*) og to slægter af havbørsteorme (*Heteromastus* og *Hediste*) ikke taber signifikant i vægt i perioden fra 21–90 dage efter konservering, uanset om konserveringsmidlet er formalin eller ethanol (alkohol). Dette studie står imidlertid forholdsvis alene med denne observation, og er i modstrid med en del af den ældre litteratur på området. Herudover kan det bemærkes, at der er store standardafvigelser på de data, der er præsenteret i Wetzel m.fl. (2005), og forfatterne har heller ikke angivet vægten af forsøgsdyrene. Sidstnævnte er kritisk, fordi store dyr bidrager uforholdsmæssigt meget til den samlede biomasse, og man må formode, at i store og fedtholdige dyr går der længere tid, før puljen af alkoholopløselige bestanddele er opløst og trukket ud af dyrenes væv. Wetzel's studie er citeret 26 gange, hvoraf 10 citationer omhandler benthiske organismer. I fire af studierne anvendes der ethanolkonservering med henvisning til Wetzel's studie (Kestrup og Ricciardi 2010; Koop m.fl. 2008; Netto et al. 2012; Rodrigues et al. 2012). De øvrige 6 studier (MacDonald m. fl. 2012a og b; Rennie m. fl. 2012, Rosati et al. 2012, Paavo m.fl. 2008, Zintzen et al. 2008a og b) referer til Wetzel's studie, men anvender formalin efterfulgt af ethanolkonservering. Det må således konkluderes, at Wetzel's studie står forholdsvis alene, og at der er behov for supplerende undersøgelser, før man kan lægge dette studie til grund for metodeændringer.

I dette forsøg undersøger vi vægtændringer af bundfauna ved bestemmelse af vådvægt over længere tids opbevaring (>1 år) i alkohol (ethanol-konservering), og tester hypoteserne:

- 1) Alkoholkonservering medfører først et hurtigt vægttab, fordi den lettere konserveringsvæske erstatter vandet i dyrenes væv og bidrager herudover evt. til kontrahering af vævet.
- 2) Over tid observeres et gradvist vægttab grundet opløsning af alkoholopløselige organiske forbindelser i dyrene.
- 3) Det samlede vægttab afhænger af organismernes taksonomiske tilhørsforhold og evt. af dyrenes størrelse, idet vægttabet i store dyr forventes at foregå langsommere end i små dyr.

2 Metoder

Det faunamateriale, der indgik i forsøget, blev indsamlet den 13. maj 2014 af Naturstyrelsen med 0,1 m² Van Veen grab i Aarhus Bugt på stationer, der ligger i stationsnettet AB05 (56°13 -56°15 N - 10°20-10°24 Ø). Prøvetagningspositionerne dækker et dybdeinterval på 8,5 – 13,5 m, hvor bunden består af siltet mudder med et højt indhold af organisk materiale. Ifølge feltjournalen forekom der sulfidlugt fra enkelte prøver. Lokaltiteten var udvalgt fordi der var en kendt forekomst af store individer af både havbørsteormeslægten *Hediste*, store muslinger af slægterne *Mytilus* og *Arctica* samt krebsdyr og pighuder. Det blev dermed sikret, at dyr fra samtlige fire taxonomiske hovedgrupper, der omfatter de fleste arter af blødbundfaunaen, kunne indgå i undersøgelsen. Prøverne blev sigtet ombord (0,1 mm sigte) og lagt på køl (uden konservering), hvorefter prøvematerialet blev fragtet til laboratoriet, hvor forsøgene blev sat op. Dyrene blev konserveret indenfor 24 timer, og alle dyr var i live ved forsøgets start.

Forsøget med alkoholkonservering blev gennemført i 36 forsøg, hver med kun en art/slægt (Tabel 1). Til hvert forsøg blev dyrene sorteret i slægter og udvalgt enkeltvis eller i grupper med op til 11 individer af samme slægt, hvis dyrene var små. Puljen af flere små dyr gav en tilstrækkelig stor biomasse til at mindske usikkerheden ved vejningen.

Gruppen af ledorme (Annelida) blev i 17 forsøg repræsenteret ved havbørsteormeslægterne *Hediste*, *Nephtys* eller *Polynoides* samt i 3 forsøg, hvor børsteormene ikke blev bestemt til slægt. Gruppen af bløddyr (Mollusca) blev repræsenteret i 3 forsøg med snegleslægten (*Nassarius* sp.) og i 10 forsøg med muslingerne *Arctica islandia*, *Abra* sp., *Mytilus edulis*, *Corbula gibba* og *Venerupsis* sp. Gruppen af pighuder (Echinodermata) blev repræsenteret med slangestjernen (*Ophiura* sp.) i 4 forsøg. Endelig blev udviklingen i vægten af led-dyr (Arthropoda) undersøgt i to forsøg med krabbeslægterne *Carcinus* og *Macropodia* (Decapoda). Den levende vægt i forsøgene ved forsøgsstart varierede mere end tre størrelsesordner fra 32 milligram (*Ophiura* sp.) til 92 gram (*Mytilus* sp.).

Alle vejningerne blev udført i henhold til de tekniske anvisninger for blødbundsfauna (TA-19) (Hansen m.fl. 2013), som foreskriver, at væske på overfladen af dyrene fjernes ved at lægge dyrene på et filterpapir forud for vejningen. I alle forsøg blev dyrene vejte både før og umiddelbart efter fikseringen i 70 % alkohol. Disse vejtidspunkter er i det følgende angivet med henholdsvis dag "0" og dag "1" efter forsøgets start. Herefter blev materialet vejte regelmæssigt i løbet af de følgende 16 måneder med gradvis længere og længere tidsintervaller mellem vejningerne. Således blev der i starten foretaget målinger med få dages intervaller, herefter ugentligt og senere med månedslange intervaller. Sidste måling blev foretaget i august 2015 – 460 dage efter forsøgets start. Dyrene blev opbevaret i den samme alkohol for at gøre forsøgsbetingelserne så realistiske som muligt, da der ikke skiftes alkohol på prøverne mellem feltindsamlingen og laboratorieanalysen. Der blev ikke efterfyldt med alkohol, og eventuel fordampning fra prøverne blev ikke målt, men antages at være minimal og uden væsentlig indflydelse på vejteallene. Vejningerne blev konsekvent foretaget af samme person og usikkerheden i vejteallene, som skyldes selve vejteproceduren (affugtning af dyrene), er undersøgt ved gentagne vejninger af samme prøve på samme tidspunkt efter forsøgets afslutning.

Tabel 1. Skema over de individuelle forsøg med angivelse af identifikationsnummer (ID), dyregruppe der blev undersøgt (taxonomisk række), slægtens latinske navn (taxonomisk slægt), antal dyr i det enkelte forsøg (Indiv. antal) med angivelse af deres levendevægt (Vådvægt (vand)) før forsøgsstart (dag 0). N angiver antallet af målinger i løbet af forsøgets varighed i dage.

ID	Taxonomisk række	Taxonomisk slægt	Indiv. antal	Vådvægt (vand), g	N	Varighed, d
1	Mollusca	<i>Nassarius</i>	1	1,328	13	460
2	Mollusca	<i>Venerupsis</i>	1	22,402	13	460
3	Annelida	<i>Hediste</i>	2	9,399	13	460
4	Annelida	<i>Nephtys</i>	11	2,316	13	460
5	Arthropoda	<i>Carcinus</i>	4	1,043	13	460
6	Mollusca	<i>Abra</i>	1	0,103	13	460
7	Mollusca	<i>Arctica</i>	1	48,875	13	460
8	Annelida	<i>Hediste</i>	2	7,291	13	460
9	Annelida	<i>Nephtys</i>	3	0,76	13	460
10	Echinodermata	<i>Ophiura</i>	3	0,098	13	460
11	Mollusca	<i>Corbula</i>	2	0,113	13	460
12	Annelida	<i>Hediste</i>	2	10,615	13	460
13	Annelida	<i>uidentificeret</i>	9	3,181	13	460
14	Echinodermata	<i>Ophiura</i>	2	0,773	13	460
15	Annelida	<i>Nephtys</i>	3	0,276	13	460
16	Mollusca	<i>Mytilus</i>	2	91,566	13	460
17	Animalia	<i>uidentificeret</i>	1	0,44	13	460
18	Echinodermata	<i>Ophiura</i>	2	0,087	13	460
19	Annelida	<i>uidentificeret</i>	4	0,458	13	460
20	Annelida	<i>Hediste</i>	3	3,859	13	460
21	Annelida	<i>Nephtys</i>	2	1,095	12	245
22	Annelida	<i>uidentificeret</i>	1	5,98	13	460
23	Arthropoda	<i>Macropodia</i>	1	0,671	13	460
24	Annelida	<i>Polynoides</i>	3	0,759	13	460
25	Mollusca	<i>Arctica</i>	1	25,423	13	460
26	Annelida	<i>Hediste</i>	4	18,953	13	460
27	Mollusca	<i>Mytilus</i>	4	87,041	13	460
28	Mollusca	<i>Nassarius</i>	1	1,303	13	460
29	Annelida	<i>Hediste</i>	1	10,623	13	460
30	Mollusca	<i>Nassarius</i>	1	0,243	13	460
31	Mollusca	<i>Mytilus</i>	1	14,122	13	460
32	Echinodermata	<i>Ophiura</i>	1	0,025	13	460
33	Mollusca	<i>Abra</i>	1	0,029	13	460
34	Mollusca	<i>Mytilus</i>	9	123,508	13	460
35	Annelida	<i>Hediste</i>	5	41,133	13	460
36	Annelida	<i>Hediste</i>	2	5,965	13	460

3 Resultater og diskussion

3.1 Vægtændringer

Efter tilsætning af alkohol skete der i løbet af det første døgn et markant væggtab på mellem 2 og 37 % (gennemsnit 15 %) i forhold til vægten af det levende materiale (Tabel 2). Dette væggtab forklares ved det vand, der drænes væk, når væsken i dyrenes væv erstattes med 70 % alkohol, som har en mindre massefylde. Herudover kan konserveringen bidrage til kontrahering af vævet (reduktion i volumen), så væske så at sige presses ud af dyret. Denne "drænbare" pulje af biomassen var signifikant (Mann Whitney rank sum test, $P=0,004$) forskellig mellem de taxonomiske hovedgrupper således, at de skalbærende mollusker (Mollusca), pighuder (Echinodermata) og led-dyr Arthropoda kun viste en ca. 10 % reduktion (median 11,2 %), medens børsteormene (Polychaeta, Annelida) havde et væggtab på ca. 20 % i forbindelse med alkoholfikseringen (median 20 %). I to forsøg med muslinger (ID 7 og 25) var vægttabet dog væsentligt større, hvilket kan skyldes, at der var vand i kappehulen ved første vejning. Dette vand kan være svært at dræne væk på levende muslinger, specielt i de tilfælde hvor skallerne forbliver tæt lukkede efter konservering.

Efterfølgende blev der i alle prøver observeret en gradvis reduktion af dyrenes vægt (se Appendix 1), med undtagelse af prøve ID 6, hvor skallerne på *Abra* netop forblev tæt lukkede. Efter afslutningen af forsøget blev skallerne på *Abra* i prøve ID 6 åbnet og i løbet af få dage reduceredes biomassen yderligere med ca. 8 %.

Vægttabet forløb over hele forsøgsperioden, hvor der forsvandt yderligere op til 78 procent af vægten, således at den samlede vægt efter 460 dage nåede ned på mellem 4 og 80 % af startvægten for de/det levende dyr (Tabel 2).

Tabel 2. Vægtændringer i individuelle forsøg sorteret efter taxonomisk hovedgruppe. "Red. vand-alkohol" angiver vægttabet i gram efter et døgn i alkohol. Samlet væggtab er målt over 460 dage. Den procentvise reduktion er angivet i de to kolonner til højre. ID angiver forsøgsnummer som i Tabel 1. ND angiver, at der mangler data for at gennemføre beregningen.

ID	række	slægt	Startvægt, g	Red. vand-alkohol	Red. vand-alkohol, %	Samlet væggtab	Red. alkohol, %
17	Animalia	<i>Uident.</i>	0,440	0,094	21,36 %	0,181	41,14 %
3	Annelida	<i>Hediste</i>	9,399	1,154	12,28 %	4,325	46,02 %
8	Annelida	<i>Hediste</i>	7,291	0,888	12,18 %	4,582	62,84 %
12	Annelida	<i>Hediste</i>	10,615	1,111	10,47 %	6,599	62,17 %
20	Annelida	<i>Hediste</i>	3,859	0,482	12,49 %	1,470	38,09 %
26	Annelida	<i>Hediste</i>	18,953	3,652	19,27 %	8,843	46,66 %
29	Annelida	<i>Hediste</i>	10,623	2,133	20,08 %	7,850	73,90 %
35	Annelida	<i>Hediste</i>	41,133	4,037	9,81 %	32,249	78,40 %
36	Annelida	<i>Hediste</i>	5,965	0,783	13,13 %	2,460	41,24 %
4	Annelida	<i>Nephtys</i>	2,316	0,484	20,90 %	0,966	41,71 %
9	Annelida	<i>Nephtys</i>	0,760	0,271	35,66 %	0,485	63,82 %
15	Annelida	<i>Nephtys</i>	0,276	0,092	33,33 %	0,195	70,65 %
21	Annelida	<i>Nephtys</i>	1,095	0,221	20,18 %	ND	ND
24	Annelida	<i>Polynoides</i>	0,759	0,154	20,29 %	0,348	45,85 %
13	Annelida	<i>Uident.</i>	3,181	0,807	25,37 %	1,971	61,96 %
19	Annelida	<i>Uident.</i>	0,458	0,081	17,69 %	0,213	46,51 %
22	Annelida	<i>Uident.</i>	5,980	2,112	35,32 %	4,024	67,29 %
5	Arthropoda	<i>Carcinus</i>	1,043	0,078	7,48 %	0,835	80,06 %
23	Arthropoda	<i>Macropodia</i>	0,671	0,084	12,52 %	0,312	46,50 %
10	Echinodermata	<i>Ophiura</i>	0,098	0,011	11,22 %	0,035	35,71 %
14	Echinodermata	<i>Ophiura</i>	0,773	0,067	8,67 %	0,266	34,41 %
18	Echinodermata	<i>Ophiura</i>	0,087	0,007	8,05 %	0,028	32,18 %
32	Echinodermata	<i>Ophiura</i>	0,025	0,003	12,00 %	0,009	36,00 %
6	mollusca	<i>Abra</i>	0,103	0,003	2,91 %	ND	ND
33	mollusca	<i>Abra</i>	0,029	0,004	13,79 %	0,016	55,17 %
7	mollusca	<i>Arctica</i>	48,875	18,307	37,46 %	20,066	41,06 %
25	mollusca	<i>Arctica</i>	25,423	6,688	26,31 %	9,043	35,57 %
11	mollusca	<i>Corbula</i>	0,113	0,006	5,31 %	0,054	47,79 %
16	mollusca	<i>Mytilus</i>	91,566	11,633	12,70 %	24,603	26,87 %
27	mollusca	<i>Mytilus</i>	87,041	13,207	15,17 %	23,191	26,64 %
31	mollusca	<i>Mytilus</i>	14,122	2,094	14,83 %	2,829	20,03 %
34	mollusca	<i>Mytilus</i>	123,508	22,328	18,08 %	38,702	31,34 %
1	mollusca	<i>Nassarius</i>	1,328	0,068	5,12 %	0,159	11,97 %
28	mollusca	<i>Nassarius</i>	1,303	0,079	6,06 %	0,124	9,52 %
30	mollusca	<i>Nassarius</i>	0,243	ND	ND	0,010	4,12 %
2	mollusca	<i>Venerupsis</i>	22,402	0,405	1,81 %	3,891	17,37 %

3.2 Model for vægtreduktion ved alkoholfiksering

I stort set alle forsøg aftog det procentvise væggtab med opbevaringstiden efter det første døgn (jf. hypotesen for forsøget om en gradvis opløsning af dele af vævet). Det blev derfor undersøgt, om vægttabet efter et døgn kunne beskrives som et eksponentielt henfald, således som illustreret i nedenstående konceptuelle figur (Figur 1). Det tidlige henfald er for hvert forsøg herefter fittet til en generel model, der beskriver biomassen til tiden som:

$$B_t = B_0 + \alpha * \exp(-bt) \quad (1)$$

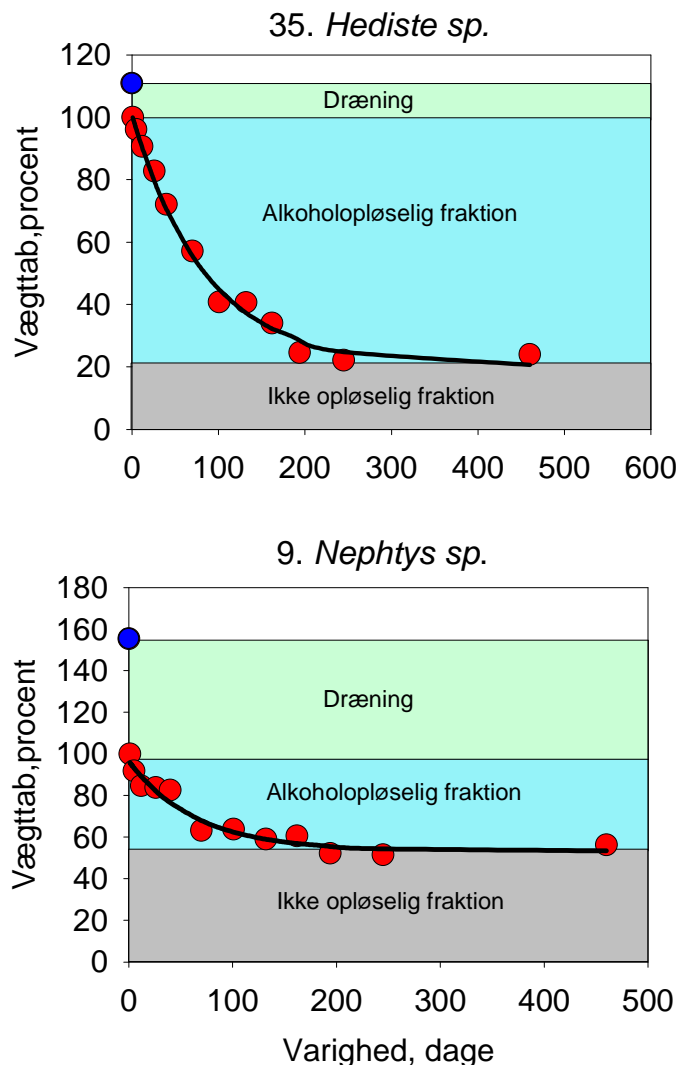
B_t angiver vægten til tiden t , B_0 er den stabile ikke-opløselige pulje og a er den alkoholopløselige pulje, der henfalder med raten b efter det første døgn (se også figur 1). Det non-lineære fit til ligning (1) kan generelt og med meget høj signifikans (i de fleste forsøg er $P < 0.0001$, Tabel 3) beskrive vægtændringerne i alle forsøgene efter det første døgn (Figur 2).

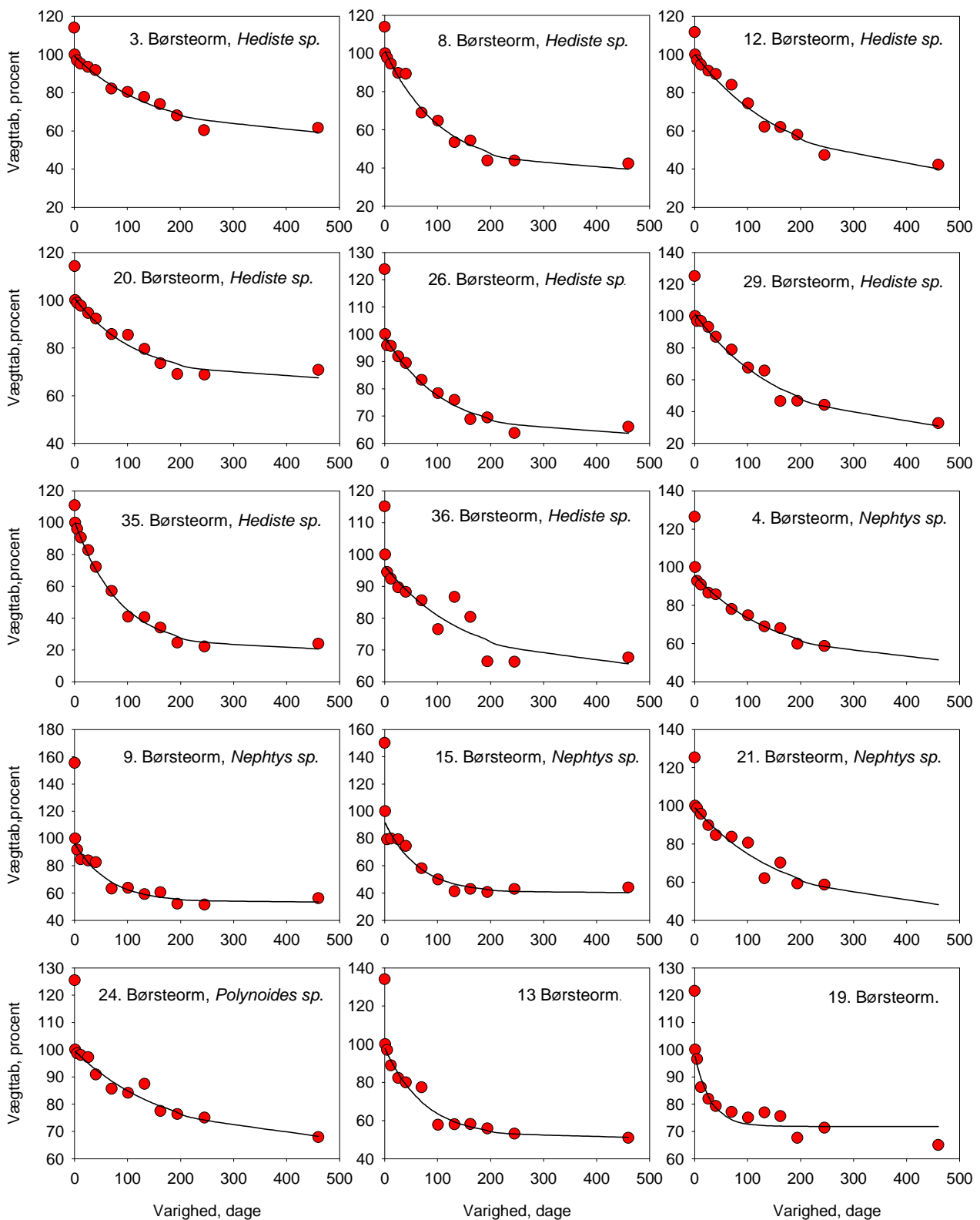
For hver prøve er flg. parametre bestemt (se Table 3):

- vægten der drænes i løbet af det første døgn (dvs. den "drænbare pulje" i gram; se Tabel 2)
- vægten af den en stabile ikke-opløselige pulje (B_0 i gram)
- vægten af den alkoholopløselige pulje (a i gram),
- den daglige henfaldsrate for den alkoholopløselige pulje (b per dag).

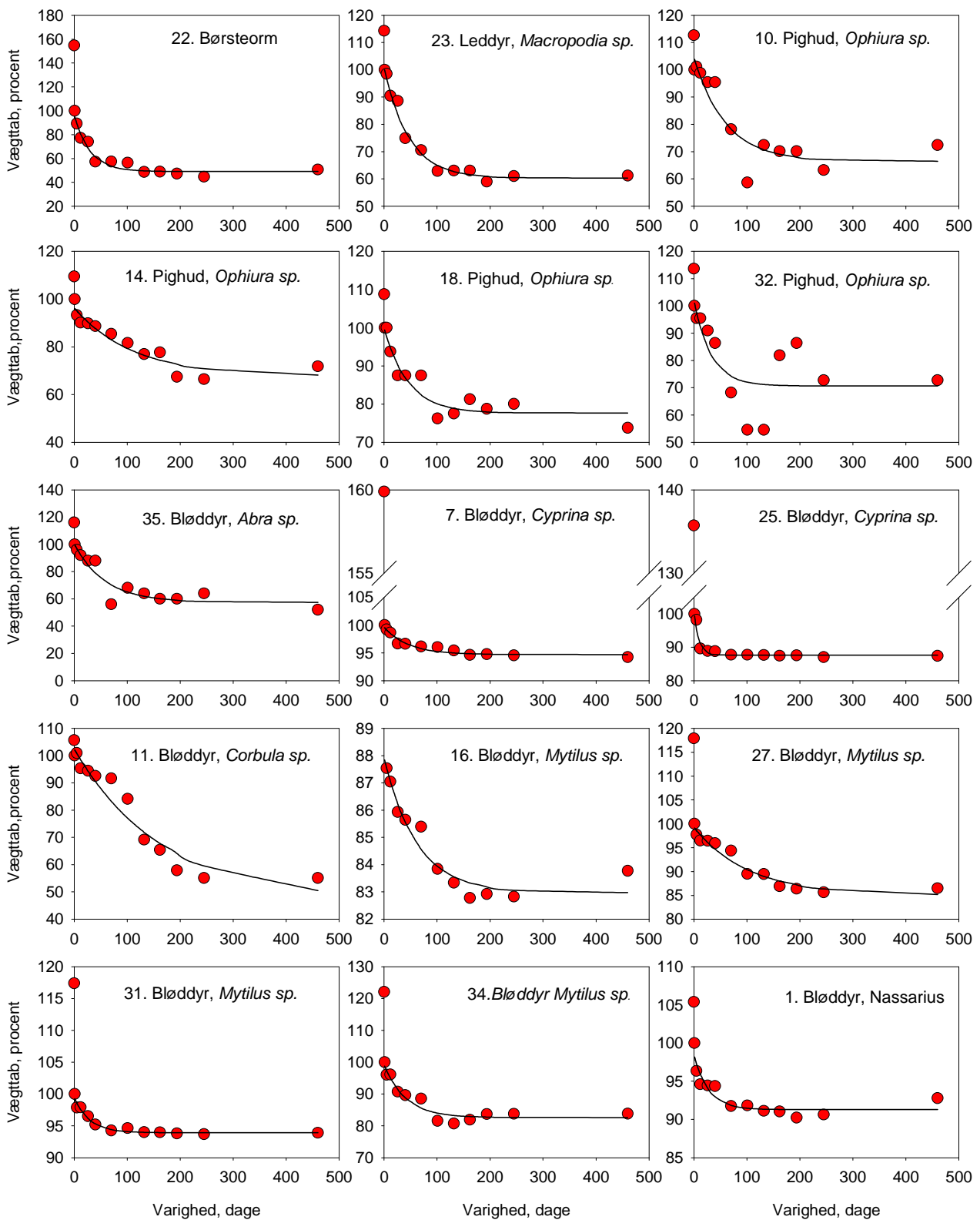
Den alkoholopløselige pulje varierede meget fra forsøg til forsøg og endda indenfor samme art. Således varierede den alkoholopløselige pulje fra 33 til 80 procent af biomassen i tilfældet med arten *Hediste virens*.

Figur 1. Konceptuel figur baseret på forsøg 35 (øverst) og 9 (nederst) med børsteormslægterne *Hediste* og *Nephtys*, som viser tre fraktioner af biomassen: Dræning angiver den del af vægten, der drænes i løbet af det første døgn, den alkoholopløselige pulje og den stabile ikke-opløselige pulje i løbet af 460 dage. Vægttabet, der sker mellem forsøgsstart til tiden 0 (markeret med blåt symbol) og dag 1, er en effekt af alkoholfikseringen og vist med grønt – normaliseret i forhold til vægten de første dage efter alkoholfikseringen (100 procent). I løbet af opbevaringen sker der et eksponentielt henfald (røde symboler) af den alkoholopløselige pulje (markeret med lyseblåt), indtil denne pulje er helt opløst og resten af biomassen er stabil (markeret med gråt). Kurven er bestemt ud fra ligning (1). Bemærk de relativt forskellige puljestørrelser hos de to arter af børsteorme.

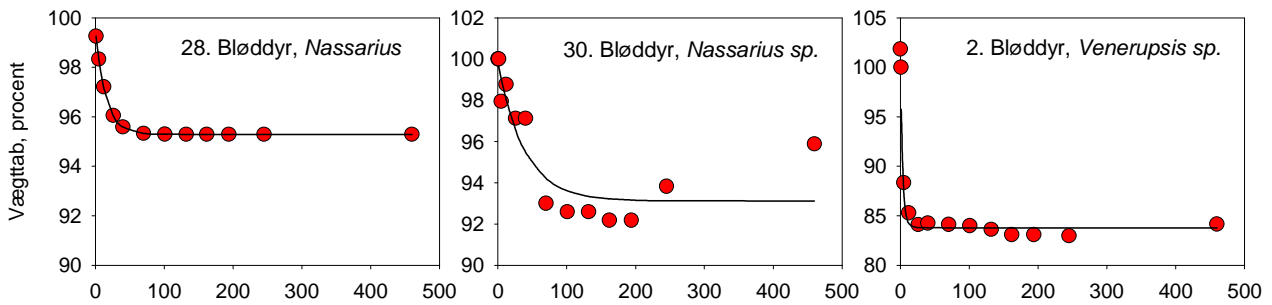




Figur 2. Vægtændring i % over op til 460 dage for hver prøve normaliseret (100 %) ift. biomassen efter et døgn's konservering i 70 % ethanol, dvs. B_0 ; se ligning (1). Blå symboler viser den %-vise relative vægt ift. B_0 . Det eksponentielle vægttab efter et døgn er bestemt ud fra ligning (1). Estimerede parametre og signifikansniveauer er vist i Tabel 3.



Figur 2- fortsat: I forsøg 16 er modellfittet foretaget på data i perioden 4-460 dage efter alkoholtilsætning, da det formodes, at den drænbare labile pulje ikke var fjernet efter et døgn i alkohol.



Figur 2 fortsat.

Generelt var den alkoholopløselige pulje, som forventet, signifikant mindre hos de skalbærende grupper af pighuder, leddyr og bløddyr. Det kan forklares ved, at deres ydre skelet bidrager væsentligt til vådvægten (Mann Whitney rank sum test, $P < 0,0001$, $N_{annelida} = 17$, $N_{andre} = 17$). For bløddyrerne, der hovedsageligt bestod af muslinger, kan der generelt være tale om en overestimering af den alkoholopløselige pulje, da en del af den drænbare pulje kan være medregnet i den alkoholopløselige pulje, fordi vandet som tidligere beskrevet ikke kunne drænes ud af de lukkede skaller. Årsagerne til den store variation i den alkoholopløselige pulje indenfor samme slægt (og art) af børsteorm (*Hediste virens*) er ikke kendt, men der ses en tendens til, at den alkoholopløselige pulje var relativt større i de prøver, hvor individerne var størst (Figur 3). En forklaring kan være et højere fedtindhold i store individer, eventuelt pga. modne gonader da dyrene blev indsamlet i maj, hvor *Hediste* ofte gyder. Der var ingen tydelig forskel i den alkoholopløselige puljes henfaldsrate (a) mellem de forskellige taxonomiske hovedgrupper. I gennemsnit var den alkoholopløselige puljes henfaldsrate $2,8 \text{ \% d\ddot{a}gn}^{-1}$ ($\pm 5 \text{ \% standardafvigelse}$), men henfaldsraten varierede fra $0,56 \text{ \%}$ til 30 \% (median $1,5 \text{ \%}$) (Tabel 3). Den store standardafvigelse skyldes muslingerne, hvor der som beskrevet, i enkelte af prøverne var problemer med dræningen af kappehulen. For børsteormene, hvor dette problem ikke forekom, var variationen følgelig mindre og varierede fra $0,56 \text{ \%}$ til $3,38 \text{ \%}$ med en middelværdi på $1,6 \text{ \%}$ ($\pm 0,9 \text{ \% standardafvigelse}$) (Tabel 3).

Figur 3. Vægten af den alkoholopløselige biomasse (α) i procent af total vægt ($= \alpha + BO$) hos børsteormen *Hediste virens* som funktion af den gennemsnitlige individvægt i 8 individuelle forsøg. Errorbars angiver standardafvigelsen på estimatet for α . Regressionen (den rette linje) er ikke signifikant ($P=0,057$)

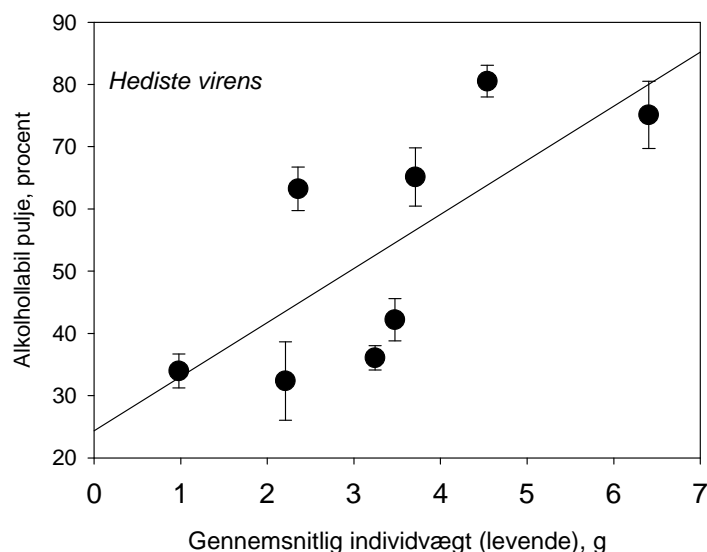


Table 3. Målte og modellerede parametre for alkoholopløselige og stabile puljer af faunabiomassen i alkoholfikserede prøver. Målt dræn angiver vægtreduktionen i forhold til den levende vægt, mens procentsatserne for B_0 og α angiver procent af vægten målt efter alkoholfiksering (dvs. efter et døgn opbevaring i alkohol). Summen af B_0 og α afviger lidt fra 100 %, da dette kriterium ikke var sat som randbetingelse for regressionsanalysen.

ID	slægt	Målt dræn (dag 0-1), %	B_0 , %	α , %	b, % dag-1	P (B_0)	P(α)	P(b)
17	<i>Uident.</i>	21,4	73±1,8	27±1,8	0,88±0,16	<0,0001	<0,0001	0,0003
3	<i>Hediste</i>	12,3	57±3,5	42±3,3	0,65±0,12	<0,0001	<0,0001	0,0005
8	<i>Hediste</i>	12,2	38±3,4	63±3,5	0,96±0,14	<0,0001	<0,0001	<0,0001
12	<i>Hediste</i>	10,5	35±4,8	65±4,6	0,56±0,09	<0,0001	<0,0001	0,0001
20	<i>Hediste</i>	12,5	66±2,7	33±2,7	0,86±0,18	<0,0001	<0,0001	0,0009
26	<i>Hediste</i>	19,3	63±1,9	36±1,9	0,92±0,13	<0,0001	<0,0001	<0,0001
29	<i>Hediste</i>	20,1	26±5,6	75±5,4	0,61±0,1	0,0011	<0,0001	0,0002
35	<i>Hediste</i>	9,8	20±2,3	80±2,5	1,18±0,1	<0,0001	<0,0001	<0,0001
36	<i>Hediste</i>	13,1	64±6,5	32±6,3	0,66±0,3	<0,0001	0,0006	0,0567
4	<i>Nephtys</i>	20,9	49±7,4	46±6,9	0,65±0,2	0,0002	0,0001	0,0105
9	<i>Nephtys</i>	35,7	53±2,6	43±3,2	1,55±0,34	<0,0001	<0,0001	0,0014
15	<i>Nephtys</i>	33,3	40±3,6	52±4,4	1,59±0,4	<0,0001	<0,0001	0,0033
21	<i>Nephtys</i>	20,2	44±16,	54±15,	0,59±0,32	0,0255	0,0075	0,0994
24	<i>Polynoides</i>	20,3	65±3,9	33±3,7	0,57±0,14	<0,0001	<0,0001	0,0027
13	<i>Uident.</i>	25,4	51±2,6	47±3,0	1,33±0,24	<0,0001	<0,0001	0,0004
19	<i>Uident.</i>	17,7	71±1,6	26±3,2	3,4±1,11	<0,0001	<0,0001	0,0134
22	<i>Uident.</i>	35,3	49±1,7	47±3,3	3,38±0,65	<0,0001	<0,0001	0,0005
23	<i>Macropodia</i>	12,5	60±1,2	40±1,8	2,14±0,28	<0,0001	<0,0001	<0,0001
10	<i>Ophiura</i>	11,2	66±4,1	38±5,3	1,67±0,69	<0,0001	<0,0001	0,0392
14	<i>Ophiura</i>	8,7	67±3,5	28±3,6	0,9±0,3	<0,0001	<0,0001	0,0142
18	<i>Ophiura</i>	8,0	77±1,6	22±2,4	2,2±0,7	<0,0001	<0,0001	0,0117
32	<i>Ophiura</i>	12,0	70±4,9	31±8,9	3,08±2,41	<0,0001	0,0068	0,2331
33	<i>Abra</i>	13,8	57±3,9	42±5,1	1,73±0,61	<0,0001	<0,0001	0,0195
7	<i>Arctica</i>	37,5	94±0,2	4,±0,3	2,17±0,5	<0,0001	<0,0001	0,0018
25	<i>Arctica</i>	26,3	87±0,3	13±1,0	10,82±2,21	<0,0001	<0,0001	0,0009
11	<i>Corbula</i>	5,3	47±7,3	55±7,0	0,61±0,18	0,0001	<0,0001	0,0075
16	<i>Mytilus</i>	12,7	82±0,4	4,±1,5	1,62±10,01	<0,0001	<0,0001	0,0068
27	<i>Mytilus</i>	15,2	85±1,1	14±1,2	0,97±0,22	<0,0001	<0,0001	0,0018
31	<i>Mytilus</i>	14,8	93±0,1	5,±0,3	3,43±0,58	<0,0001	<0,0001	0,0002
34	<i>Mytilus</i>	18,1	82±0,9	16±1,4	2,44±0,61	<0,0001	<0,0001	0,0032
1	<i>Nassarius</i>	5,1	91±0,4	7,±0,9	3,63±1,29	<0,0001	<0,0001	0,0206
28	<i>Nassarius</i>	6,1	95±0,2	4,±0,7	6,6±2,88	<0,0001	0,0002	0,0477
30	<i>Nassarius</i>	0,0	93±0,6	6,±1,1	2,59±1,22	<0,0001	0,0002	0,0636
2	<i>Venerupsis</i>	1,8	83±0,1	16±0,6	29,99±3,15	<0,0001	<0,0001	<0,0001

3.3 Konsekvenser af opbevaringens varighed for biomassebestemmelsen af bundfauna-prøver

De gennemførte forsøg gør det muligt at forudsige konsekvenserne af alkoholkonserveringen (dvs. opbevaringstiden), da den anvendte model, dvs. ligning (1), viser en meget høj forklaringsgrad for de målte data.

Både gældende metodeforskrifter og analysepraksis i Naturstyrelsen betyder, at alkoholkonserverede prøver opbevares i mindst 1 måned, inden de oparbejdes. Ved spørgsmålet om opbevaringstiden for alkoholkonserverede prøver kan udvides fra 3 til 12 måneder, er størrelsen på den drænbare pulje, altså det vægttab der registres indenfor det første døgn af konserveringen, derfor mindre relevant. Størrelsen af den alkoholopløselige pulje og det daglige

vægttab (dvs. henfaldsraten) har derimod stor betydning, når det skal afgøres, om opbevaringstiden kan øges ud over 3 måneder.

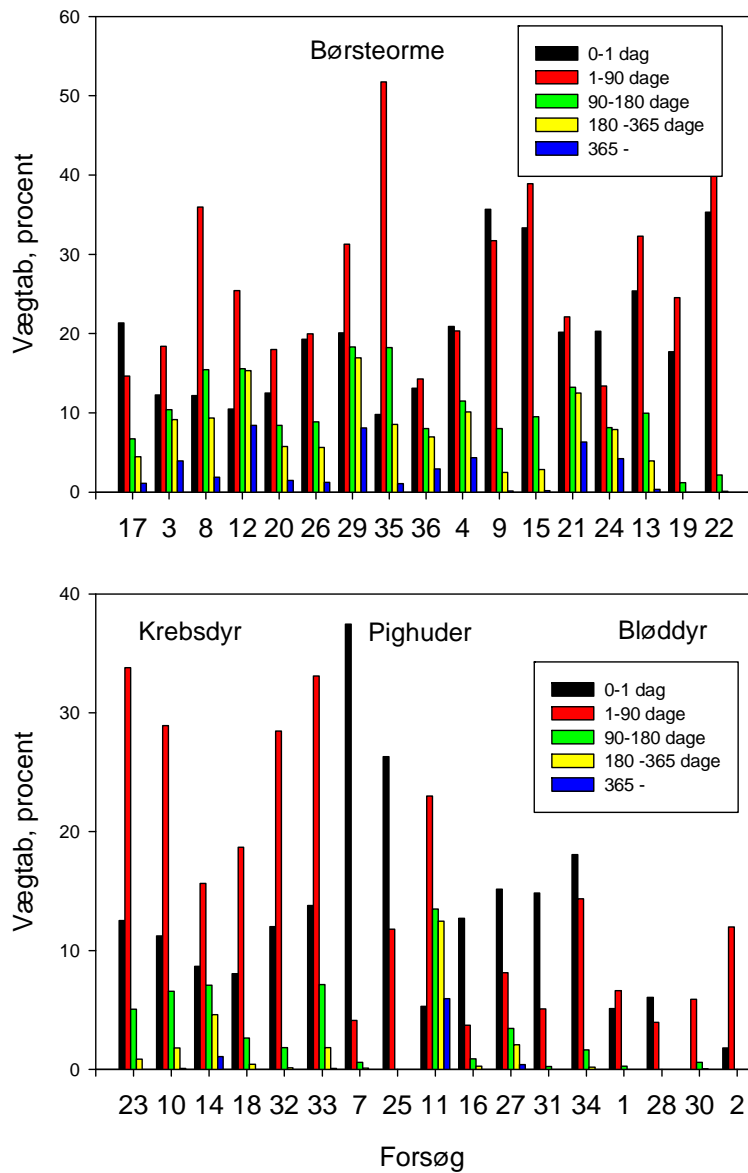
For hver prøve er det forventede vægttab beregnet ved

- 1) alkoholfikseringen i sig selv (0-1 dag)
- 2) efter 3 måneder (90 dage)
- 3) 6 måneder (182 dage)
- 4) 12 måneder
- 5) uendelig lang opbevaring.

Efter 3 måneders konservering i ethanol har børsteorm i gennemsnit mistet ca. 18 % af deres vådvægt ud over vægttabet på 20 %, som finder sted indenfor det første døgn i forbindelse med dræningen. De øvrige grupper taber i samme periode yderligere ca. 14 % af vægten efter dræningen (Figur 4, data listet i Appendiks 2). I perioden fra 3 til 6 måneder vil biomassen i gennemsnit blive reduceret med 10 % for børsteorme og ca. 3 % for de øvrige grupper. Hvis oparbejdningen udskydes til mellem 6 og 12 måneder, bidrager dette til en yderligere reduktion i børsteormenes vægt på ca. 7 % og for de øvrige grupper 1-3 %. Hvis man sammenligner den vægt der ville blive rapporteret efter 6 måneder i stedet for 12 måneder, svarer dette metodeskift til en ca. 13 % reduktion i vejetalene. Ved flere års opbevaring (ud over et år) forventes der et vægttab på yderligere ca. 2 % i gennemsnit for alle grupper.

Hvis biomassen udtrykkes ved tørvægt eller askefri tørvægt, forventes det, at vægttabet vil være relativt større i sammenligning med vådvægtbestemmelse. Det større vægttab opstår fordi vand, som ikke drænes væk ved tilsætningen af alkohol, fordampes ved tørringen og derfor ikke indregnes i biomassen. Når opbevaringstiden forlænges, øges dermed også usikkerheden på bestemmelsen af tørvægten. I tilfælde hvor askefri tørvægt (ASFW) bruges som mål for biomassen, forventes der et endnu større vægttab på især molluskerne, da skallerne forbrændes og dermed ikke bidrager til vægten.

Figur 4. Øverst: Procentvis reduktion i børsteormenes biomasse fordelt på perioderne: 0–1 dag (dvs. "drænet pulje"; sorte søjler). Vægttab i % som følge af tab fra den alkoholopløselige pulje mellem 1-90 dage (røde søjler), 90–180 dage (grønne søjler), 180-365 dage (gule søjler) og > 365 dage (blå søjler). Numre på X-aksen angiver prøvenummer (ID). Nederst: Som ovenstående men for grupperne krebsdyr, pighuder og bløddyr. Prøvenummer og identifikation fremgår af Tabel 1.



4 Konklusion

På baggrund af de gennemførte forsøg konkluderes det, at der foregår et betydeligt vægttab af bundfaunaen ved længere tids opbevaring (> 1 år) i 70 % alkohol. Mere end til 80 % af biomassen kan i nogle tilfælde drænes og opløses af alkohol, hvorved vægten blive reduceret til under 20 % af vægten af de levende dyr. Dyrenes biomasse kan beskrives med 3 puljer: En drænbar pulje, som forsvinder umiddelbart i forbindelse med alkoholkonserveringen, en alkoholopløselig pulje og en stabil pulje. Den alkoholopløselige pulje udgør 4-80 % af den biomasse, der er tilbage efter alkoholfikseringen og forsvinder eksponentielt med en hastighed på 0,5-3 % døgn⁻¹. Der var ikke signifikant sammenhæng mellem størrelsen af den alkoholopløselige pulje og dyrenes gennemsnitsvægt for børsteormeslægten *Hediste*.

Det kan konkluderes, at vægtmålinger af alkoholfikseret bundfauna er stabile efter 90 dage. Observationer i Wetzel m.fl. (2005) må derfor afvises som værende repræsentative for bundfauna generelt. Varigheden af alkoholopbevaringen kan dermed i sig selv bidrage, som en fejlkilde der er op til en faktor 5. Disse forsøg viser også, at der før 3 måneder, som er det tidspunkt HELCOM anbefaler som tidligste start på oparbejdningen, sker en 14-18 % reduktion af biomassen. Ved 6 måneder opbevaring kan der forventes yderligere at forsvinde 3-10 %. Hvis opbevaringstiden øges fra 6 til 12 måneder, vil fejlkilden være forøget med yderligere 1-7 % af biomassen afhængig af dyregruppe. Den procentuelle afvigelse fra 6 til 12 måneder vil tilsvarende være 2-13 %, når data sammenlignes før og efter en eventuel reduktion af opbevaringstiden.

Uanset om tidsperioden for oparbejdning indsnævres, synes det ikke muligt at korrigere for vægttabet med f.eks. tidsafhængige korrektionsfaktorer, fordi størrelsen og henfaldsraten varierer. Når det gælder vådvægten af alkoholkonserverede dyr synes det ikke muligt at kombinere hensynet til både at opnå en vægtbestemmelse, der ligger så tæt på den levende vægt som muligt, og høj grad af sammenlignelighed. De mest reproducerbare resultater vil man få efter så lang opbevaringstid som muligt, men det vil samtidigt være den procedure, der giver de mindste vejtal der afviger mest fra dyrenes levende vægt. En generel anbefaling vil derfor være, at man i de tilfælde, hvor der foreligger tidsserier, bibeholder den samme opbevaringstid. Eventuelt kan variation i opbevaringsperioden mindskes omkring den gennemsnitlige opbevaringstid. Herudover vil det være muligt, at beregne den vægt som prøven havde umiddelbart efter alkoholtilsætning ved at foretage gentagne vejninger og herefter beregne en vægt svarende til summen af B_0 og α .

5 Litteratur

Kestrup A, Ricciardi A (2010) Influence of conductivity on life history traits of exotic and native amphipods in the St. Lawrence River. *Fundamental and Applied Limnology* 176 (3): 249-262

Koop JHE, Shäeffler M, Ortmann C.... (2008) Toward environmental assessment of river ecosystems by analyzing energy reserves of aquatic invertebrates. *Limnologica* 38 (3-4) 378-387

MacDonald TA, Burd BJ, van Roodselaar A (2012) Size structure of marine soft bottom macrobenthic communities across natural habitat gradients: Implication for productivity and ecosystem function. *PLoS One* 7 (7): e40071

MacDonald TA, Burd BJ, van Roodselaar A (2012) Facultative feeding and consistency of trophic structure in marine soft-bottom macrobenthic communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 445: 129-140

Netto SA, Domingos AM, Kurtz MN (2012) Effects of artificial Breaching of a temporarily open/closed estuary on benthic macroinvertebrates (Camacho Lagoon, Southern Brazil). *Estuaries and Coasts* 35(4): 1069-1081.

Rennie MD, Evans DO (2012) Decadal changes in benthic invertebrate biomass and community structure in Lake Simcoe. *Freshwater Science* 31 (3): 733-749.

Rodrigues CW, Setubal P-V, Maria A (2012) Spatio-temporal and functional structure of the amphipod communities off Santos, southwestern Atlantic. *Brazilian J. Oceanography* 60: (3) 431-439.

Rosati I, Barbone E, Basset A (2012) Length-mass relationships for transitional water benthic macroinvertebrates in Mediterranean and Black Sea ecosystems. *Estuar. Coast. Shelf. Sci* 113 (SI) 231-239.

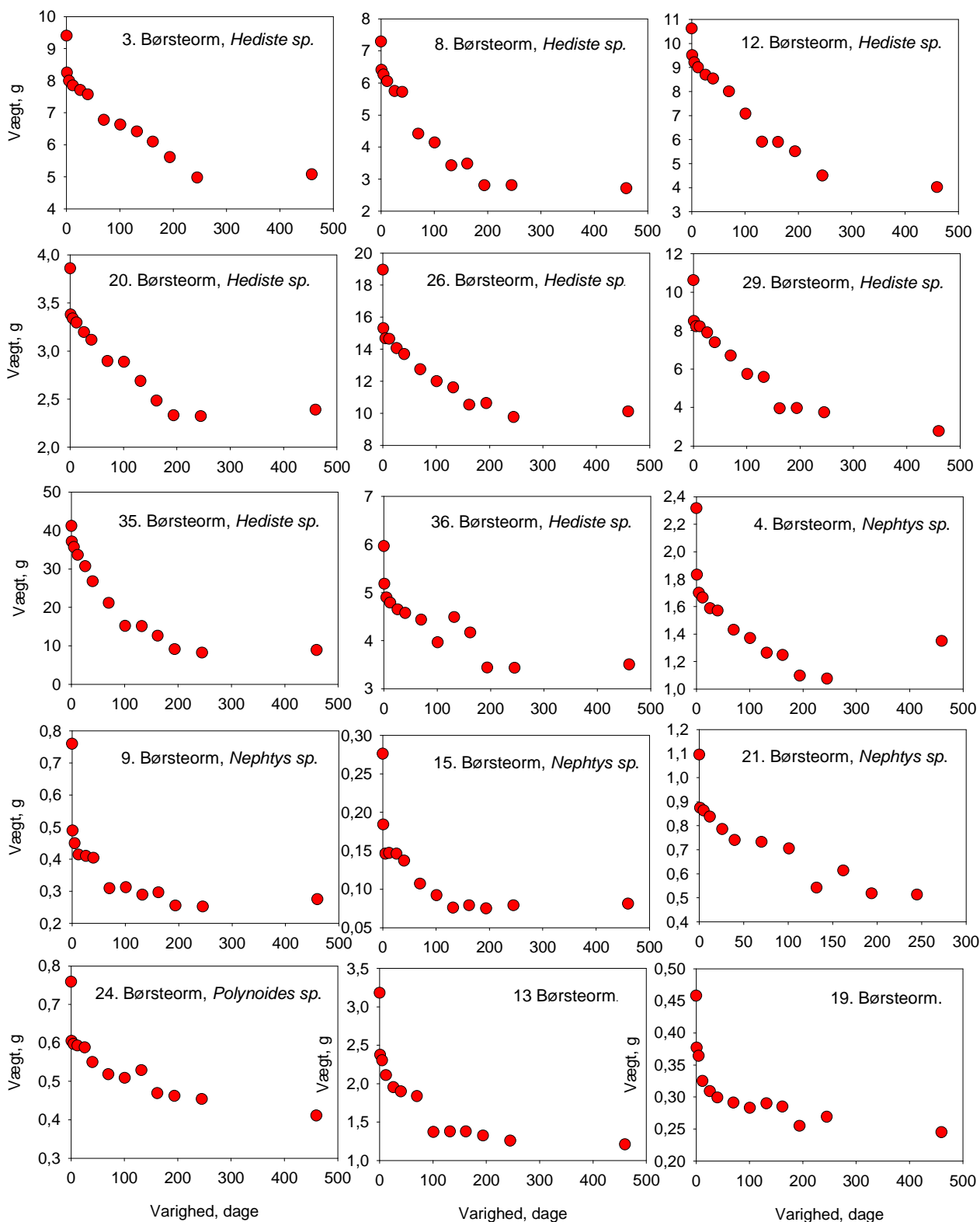
Paavo B, Ziegelmeyer A, Lavric E, (2008) Morphometric correlations and body mass regressions for *Armandia maculate* *Aglaophamus macroura* (Polychaeta) and *Zetthalia zelandica* (Gastropoda) *New Zealand J. Marine and Freshwater Research* 42 (1): 85-91

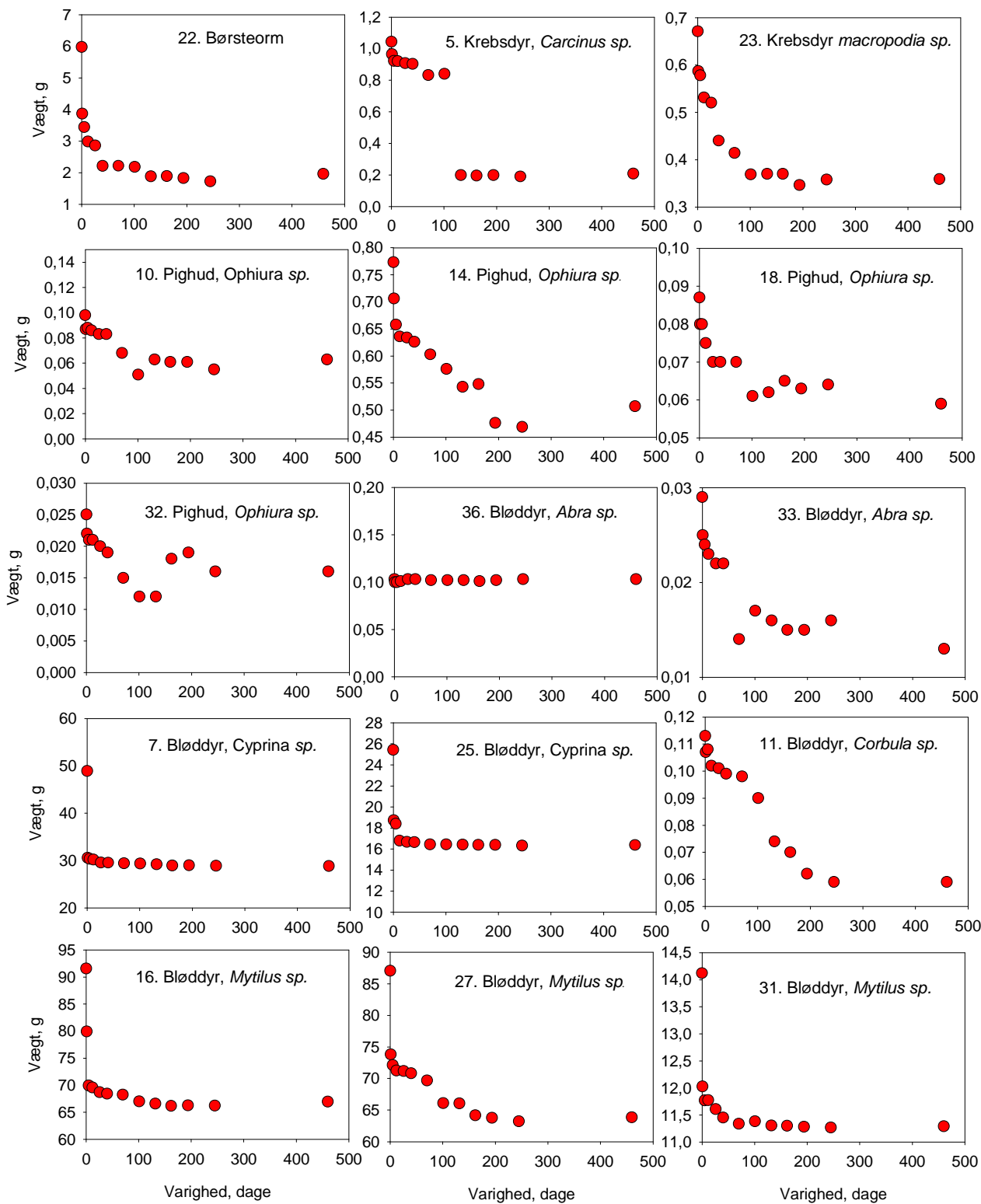
Wetzel MA, Leuchs H, Koop JH (2005) Preservation effects on wet weight, dry weight, and ash-free dry weight biomass estimates of four common estuarine macro-invertebrate: no difference between ethanol and formalin. *Helgol. Mar. Res.* 59: 2006-213.

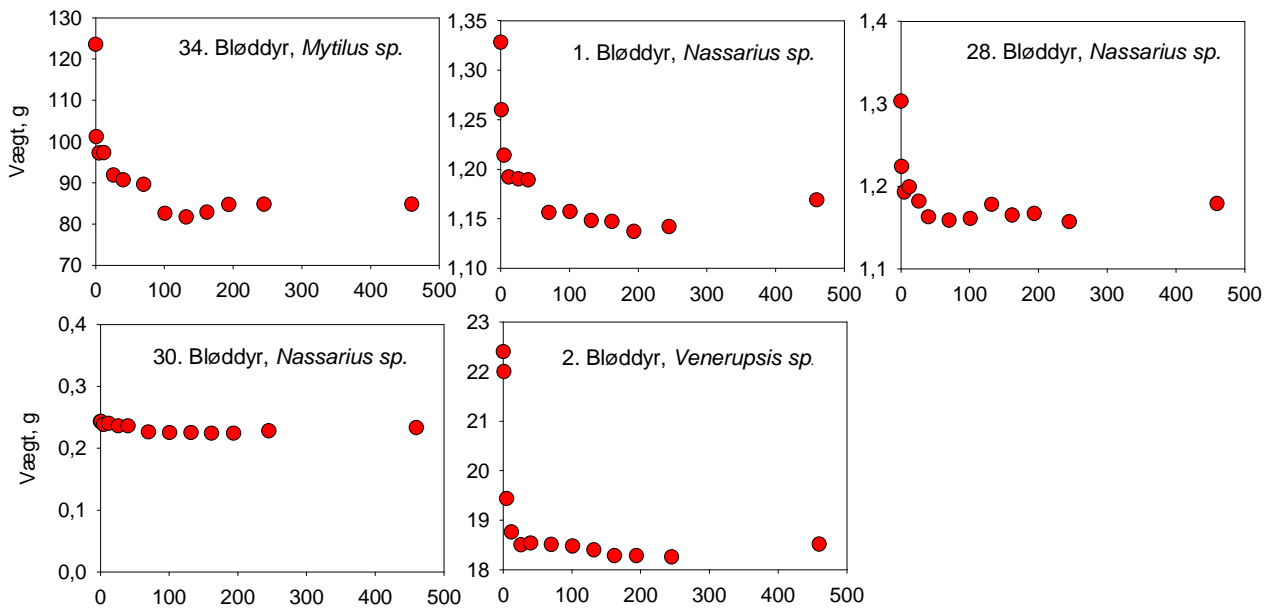
Zintzen V, Norro A, Massin C.... (2008) Spatial variability of epifauna communities from artificial habitat: Shipwrecks in the Southern Bight of the North Sea *Estuar. Coast. Shelf. Sci* 76 (2): 327-344

6 Appendix 1: Vejetal for forsøg 1-36 udført 2014-2015

Vægt vs. tid. Tiden "0" angiver den levende vægt af dyret vejlet før ethanol-konservering. Alle vægtangivelser i gram. Bemærk variable skalaer på y-aksen.







7 Appendix 2: Beregnet væggtab ved alkoholkonservering i perioderne 0-1 dag, 1-90 dage, 90-180 dage, 180-365 dage og efter 365 dage

ID	række	slægt	0-1 døgn %	1-90 døgn %	90-180 døgn %	180-365 døgn %	Efter 365 døgn
17	Animalia	<i>Uident.</i>	21,4	14,6	6,7	4,5	1,1
3	Annelida	<i>Hediste</i>	12,3	18,4	10,4	9,2	3,9
8	Annelida	<i>Hediste</i>	12,2	36,0	15,4	9,3	1,9
12	Annelida	<i>Hediste</i>	10,5	25,4	15,6	15,3	8,4
20	Annelida	<i>Hediste</i>	12,5	18,0	8,4	5,8	1,5
26	Annelida	<i>Hediste</i>	19,3	20,0	8,9	5,6	1,3
29	Annelida	<i>Hediste</i>	20,1	31,3	18,3	16,9	8,1
35	Annelida	<i>Hediste</i>	9,8	51,7	18,2	8,5	1,1
36	Annelida	<i>Hediste</i>	13,1	14,3	8,0	7,0	2,9
4	Annelida	<i>Nephtys</i>	20,9	20,3	11,5	10,1	4,3
9	Annelida	<i>Nephtys</i>	35,7	31,7	8,0	2,5	0,2
15	Annelida	<i>Nephtys</i>	33,3	38,9	9,5	2,8	0,2
21	Annelida	<i>Nephtys</i>	20,2	22,1	13,2	12,5	6,3
24	Annelida	<i>Polynoides</i>	20,3	13,4	8,1	7,9	4,2
13	Annelida	<i>Uident.</i>	25,4	32,3	9,9	3,9	0,4
19	Annelida	<i>Uident.</i>	17,7	24,5	1,2	0,1	0,0
22	Annelida	<i>Uident.</i>	35,3	43,7	2,2	0,1	0,0
23	Arthropoda	<i>Macropodia</i>	12,5	33,8	5,1	0,8	0,0
10	Echinodermata	<i>Ophiura</i>	11,2	28,9	6,6	1,8	0,1
14	Echinodermata	<i>Ophiura</i>	8,7	15,6	7,1	4,6	1,1
18	Echinodermata	<i>Ophiura</i>	8,0	18,7	2,6	0,4	0,0
32	Echinodermata	<i>Ophiura</i>	12,0	28,5	1,8	0,1	0,0
33	mollusca	<i>Abra</i>	13,8	33,1	7,1	1,8	0,1
7	mollusca	<i>Arctica</i>	37,5	4,1	0,6	0,1	0,0
25	mollusca	<i>Arctica</i>	26,3	11,8	0,0	0,0	0,0
11	mollusca	<i>Corbula</i>	5,3	23,0	13,5	12,5	6,0
16	mollusca	<i>Mytilus</i>	12,7	3,7	0,9	0,3	0,0
27	mollusca	<i>Mytilus</i>	15,2	8,1	3,5	2,1	0,4
31	mollusca	<i>Mytilus</i>	14,8	5,1	0,2	0,0	0,0
34	mollusca	<i>Mytilus</i>	18,1	14,3	1,6	0,2	0,0
1	mollusca	<i>Nassarius</i>	5,1	6,6	0,3	0,0	0,0
28	mollusca	<i>Nassarius</i>	6,1	3,9	0,0	0,0	0,0
30	mollusca	<i>Nassarius</i>	0,0	5,9	0,6	0,1	0,0
2	mollusca	<i>Venerupsis</i>	1,8	12,0	0,0	0,0	0,0

UNDERSØGELSE AF VÆGTTAB VED ALKOHOLKONSERVERING AF BUNDDFAUNA

I 2014-2015 gennemførte Det Marine FagDataCenter på foranledning af Naturstyrelsen undersøgelser af alkohol-konservering af bundfauna, for at afklare, hvor stort et vægttab, der forekommer i det konserverede materiale, og hvordan det afhænger af opbevaringsperioden. Der blev opsat 36 forsøg med 4 forskellige dyrerækker med 16 slægter af bunddyr. Dyrene blev konserveret i 70 % alkohol og vægttabet blev fulgt over 460 dage. Resultatet viste, at der efter det første vægttab indenfor et (til få) døgn efter konserveringen foregik et eksponentielt vægttab af dele af dyrenes biomasse med en gennemsnitlig rate på ca. 2,8 % om dagen (median 1,6 %). Forløbet af vægttabet kan beskrives med to labile og en stabil pulje af biomassen. I forbindelse med konserveringen skete der et hurtigt vægttab indenfor et (til få) døgn på 2-37 % (gennemsnit 15 %), som kan forklares med dræning af vand fra dyrenes væv. Herefter kan vægttabet beskrives med en generel model, der beskriver et eksponentielt vægttab mod en stabil biomasse. Modellerede parametre beskriver dels den alkoholabile pulje af biomassen og den tilknyttede henfaldsrate samt den stabile pulje. Den alkoholopløselige pulje varierede fra 5 til 80 % procent. Den samlede reduktion af biomassen, der sker som følge af alkoholkonserveringen, er op til en faktor 5. Den alkoholopløselige pulje afhænger af det taxonomiske tilhørsforhold. Skalbærende bløddyr og pighuder har en mindre alkoholopløselig pulje. På baggrund af forsøget kan det afvises, at biomassevægten er stabil efter 3 måneders opbevaring. Efter 3 måneders opbevaring kan der forventes en yderligere reduktion i vægten med ca. 18 % for havbørsteorme og ca. 10 % for alle grupper samlet. Hvis den maksimale opbevaringstid øges fra 6 til 12 måneder reduceres biomassen yderligere med i gennemsnit 7 % for havbørsteorme og 1-3 % for de øvrige dyrerækker. Hvis gældende praksis ændres fra 12 til 6 måneders opbevaring, vil metodeskiftet betyde en vægtforøgelse på op til ca. 13 % for børsteormene og ca. 2-3 % for de øvrige dyregrupper. Hvis der anvendes askefri tørvægt, forventes den relative vægtændring for bløddyrene, at ligge tættere på den der blev observeret for børsteormene.