

Til: Miljøstyrelsen

Fra: GEUS

Kopi til: Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, Departementet
Skov og Naturstyrelsen

Fortroligt: nej

Dato: 16/12-2005

GEUS-notat nr.: 05-VA-05-09

J.nr. GEUS: 0739-068

Emne: Udvaskning af steroide østrogener og coliforme bakterier fra nedfældet gylle

Udarbejdet af: Jeanne Kjær (GEUS), Carsten Suhr Jacobsen (GEUS), Preben Olsen (DJF), Ruth Grant (DMU) og Bent Halling Sørensen (DFU)

GEUS, DJF, DMU og DFU undersøger p.t., hvorvidt steroide østrogener og coliforme bakterier i nedfældet gylle - under reelle feltforhold - kan udvaskes til vandmiljøet gennem opsprækket moræneler. GEUS, DJF og DMU forestår i fælleskab alt vedrørende selve feltforsøget, DFU forestår de kemiske analyse mens GEUS forestår de mikrobiologiske analyser. Dette GEUS notat er udarbejdet i fællesskab.

De første resultater viser udvaskning og forurening af vandmiljøet med steroide østrogener og coliforme bakterier fra nedfældet sogylle. Østron (hovednedbrydningsproduktet af 17 β - ø tradiol) blev udvasket i koncentrationer, der overstiger effektgrænsen og coliforme bakterier i koncentrationer over, hvad der tillades i drikkevand. Udvaskningen overvåges stadig, og en samlet afrapportering forventes at kunne foreligge i løbet af 2006. Disse første resultater vurderes imidlertid at være relevante i relation til både landbrugets håndtering af gylle og den forestående debat vedrørende hormonbelastning af det danske vandmiljø. Derfor har GEUS valgt at orientere Miljøstyrelsen om forsøg og måleresultater i form af dette notat.

Baggrund

Husdyrgødningens bortskaffelse har igennem mange år været debatteret med hensyn til belastningen af atmosfæren og vandmiljøet med makronæringsstoffer. Nye undersøgelser har imidlertid sandsynliggjort, at også andre komponenter i husdyrgødning kan udgøre et problem for vandmiljøet (Jacobsen et al. 2005).

Det er velkendt, at sygdomsfremkaldende (patogene) bakterier findes i tarmsystemet hos husdyr. Derimod er der stort set ingen eksisterende viden om, hvordan disse patogener overlever i miljøet, og hvorvidt de ved gylleudbringning udvaskes og spredes til overflade og grundvand. De få eksisterende undersøgelser viser, at virus kan transporteres hurtigt gennem en opsprækket moræne ler (McKay et al. 1993). Forsøg fra Skotland viser at også patogene bakterier kan transporteres gennem moræneaflejringer (Vinten et al. 2002). Og en nyere dansk undersøgelse viser, at coliforme bakterier i vid udstrækning findes i det allertøverste grundvand. Coliforme bakterier således fundet i gravede brønde i forbindelse med private vandforsyningsanlæg samt i grundvandsprøver udtaget direkte under dyrkede marker (Brüsch et al. 2004, Brüsch et al. 2005).

Søer og orner har en naturlig produktion af kønshormonet østrogen, som de udskiller med gødningen. Dansk landbrug har oplevet en kraftig forskydning i svineproduktionens struktur. Samtidig med at den samlede svineproduktion er steget, er antallet af bedrifter gået kraftig tilbage og produktionen blevet mere specialiseret. Indholdet af hormoner i gylle vil være størst i de produktioner, der har en specialiseret produktion af smågrise (søbesætninger) og mindre i gylle fra slagtesvineproduktion. Hidtil har man regnet med, at østrogenerne blev bundet til jorden eller nedbrudt og dermed forsvandt i løbet af få uger efter at dyrene havde udskilt dem. Nyeste semifeltundersøgelser (kolonneforsøg med jord i naturlig lejring) udført ved Danmarks JordbrugsForskning og Danmarks Farmaceutiske Universitet (Lægdsmand et al. 2005) og MST (Kjølholt et al. 2005) viser, at når gyllen nedfældes i jorden, kan østrogenerne udvaskes til drændybde.

På den baggrund besluttede GEUS, DJF og DFU at undersøge, hvorvidt steroide østrogener og coliforme bakterier i nedfældet gylle - under reelle feltforhold - kan udvaskes til vandmiljøet gennem opsprækket moræneler

Lokalitetsbeskrivelse og monitoring

Forsøgsmarkerne Silstrup og Estrup er to af de 5 marker, der indgår i "Varlingssystemet for udvaskning af pesticider til grundvand" (Lindhardt et al. 2001, Kjær et al. 2005). De to marker er systematisk drænede i ca. 1 meters dybde og grundvandsstanden falder om sommeren til et niveau ca. 3 m.u.t. Estrupmarken er placeret nær Vejen på moræne fra næstsidste istid (bakkeø). Hovedparten af arealet er moræneler, men en del af marken består af smeltevandssand. Jordbunden - beskrevet som en JB 5/6 jord - varierer betydeligt, med et lerindhold i pløjelaget fra 10 til 20 % og et indhold af totalt organisk kulstof (TOC) fra 2 til 7,3 %. Denne komplekse jordbund og geologi vurderes ikke at være anderledes end andre marker på danske bakkeøer samt for visse dele af Østjylland. Silstrupmarken er placeret nær Thisted på moræne fra sidste istid. Jorden er beskrevet som en JB7 jord med et lerindhold i pløjelaget på 18-26 % og et TOC indhold på 2,2 %. For en nærmere beskrivelse af marken og instrumenteringen henvises til Lindhardt et al. (2001).

Monitoringen omfatter analyser af det afstrømmende drænvand. Efter udbringning af gylle blev prøverne udtaget flowproportionalt i forbindelse med kraftige afstrømningshændelser (når der blev

registreret en markant stigning i drænvandsafstrømningen). Hver enkelt prøvetagning foregik over en periode på maksimalt 1 døgn. I den periode blev for hver 3000 l drænvandsafstrømning udtaget en 200 ml delprøve. Delprøverne fra en enkelt afstrømningshændelse blev samlet i én stor prøve. Analyseresultaterne er dermed vægtede gennemsnitskoncentrationer for de enkelte afstrømningshændelser. Før gyllen blev udbragt blev udtaget en prøve, der skulle vise baggrundskoncentrationerne i drænvandet. Disse "før-prøver" blev udtaget ved "manuel grabsampling". Resultater fra grabsampels giver et øjebliksbillede af koncentrationerne i det netop da, afstrømmende drænvand.

Kemiske og mikrobiologiske analyser

Der blev målt for østrogenerne østron (E1), 17 β -østradiol (E2) og 17 α -østradiol (α E2) i alle prøverne på GC-MS/MS. Prøverne blev syrekonserveret straks efter udtagning (pH=3) og sendt til laboratoriet i frossen tilstand. Prøver af ca. 1 liter blev opkoncentreret og prøveforberedt ved hjælp af SPE og kiselgelkolonne. Østrogenene blev umiddelbart efter prøveforberedelsen elueret ud fra fastfasekolonnen med acetone og derivatiseret. Efter derivatisering blev prøverne inddampet og genopløst i 200 μ l n-heptane og sendt til analyse. Analyserne blev foretaget på et Varian 3800/1200 GC-MS (Varian Inc. California, USA) instrument.

I de gennemførte screeninger af gylle og drænvand er ikke udført kvantificering af patogene mikroorganismer. Derimod har vi anvendt total antal coliforme bakterier som en indikator for forekomst af potentielt patogene mikroorganismer. Vandprøverne blev umiddelbart efter modtagelsen i laboratoriet udpladet på petrifilm (Vail et al., 2003) og indhold af totalt coliforme bakterier og *E. coli* registreret.

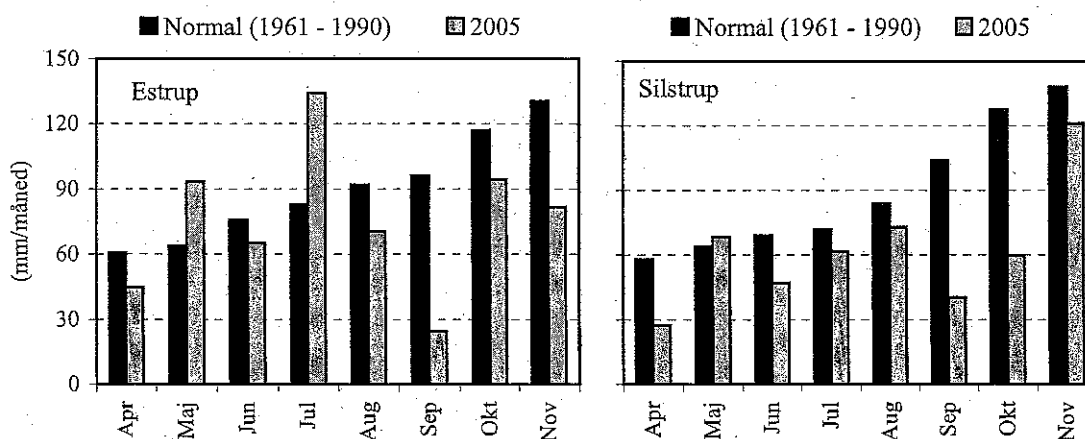
Dyrkning og nedbør

Marken ved Silstrup er beliggende på en tidligere kvæggård og blev senest tilført 35,5 tons kvæggylle/ha i 2000 og 40,3 t/ha i 2002. Marken ved Estrup tilhører et planteavlbrug med opdræt af mink. Marken har ikke været tilført gylle i en lang årrække. Der er derimod tilført fast staldgødning (dyreart ukendt). I 1996 blev udbragt 27 t gylle/ha og i 1997 12 t gylle/ha. Dyrkningen på de to lokaliteter blev gennemført som på andre konventionelle brug i regionen.

Marken ved Silstrup blev pløjet i november 2004 og efter en såbedsharvning 19. april 2005 til ca. 4 cm dybde blev der 23. april nedfældet 30,2 tons gylle/ha til ca. 8 cm dybde. Gyllen indeholdt 8,3 % tørstof og 168 kg total N/ha (98 kg NH₄-N), 10 kg P/ha og 36 kg K/ha. Koncentrationen af 17 β -østradiol, østron og coliforme bakterier i gyllen var henholdsvis 392 μ g/kg TS, 643 μ g/kg TS og 1 \cdot 10⁶ CFU/100 ml. Dagen efter blev marken tilsået med vårbyg. En mindre mængde handelsgødning - 20 N, 3 P og 10 kg K/ha- blev udbragt den 25. april. Afgrøden udviklede sig fint og den 22. august blev høstet 71,4 hkg/ha (85 % tørstof) i kerne og 29,6 hkg/ha i halm (100 % tørstof). Syv dage senere blev 15,8 t sogylle/ha slangeudlagt og straks nedpløjet. Gyllen havde et tørstofindhold på 2,9 % og samlet blev der udbragt 69 kg total-N, 10 kg P og 36 kg K/ha. Gyllen indeholdt ikke 17 β -østradiol, men koncentrationen af østron og coliforme bakterier var henholdsvis 1068 μ g/kg TS og 7 \cdot 10⁶ CFU/100ml. Marken blev tilsået med vinterraps den 1. september, der fremspirede 9 dage senere.

Ved Estrup blev 53,0 tons søgylle nedfældet til en dybde af 8-10 cm den 18. april 2005. Gyllens tørstofindhold var 3,15 % og der blev samlet udbragt 134 kg total-N (110,2 kg NH₄-N), 85 kg P og 28 kg K/ha. Gyllen indeholdt ikke 17β-østradiol, men koncentrationen af østron og coliforme bakterier i gyllen var henholdsvis 866 µg/kg TS og 1·10⁶ CFU/100. Marken blev umiddelbart efter pløjet til ca. 20 cm og samtidig hermed furepakket. Der blev i handelsgødning tilført 75 kg K/ha den 27. april og 24 kg N/ha den 28. april. Marken blev rotorharvet til 5 cm dybde den 13. maj forud for såning af majs. Samtidig med såning blev tilført 30 kg N og 15 kg P/ha som startgødning. Høstudbyttet i majshelesæden blev 143,5 hg/ha med 100 % tørstof.

Samlet set var monitoringsperioden (apr - dec) meget tør, idet der på Silstrup og Estrup faldt 26 % og 39 % mindre nedbør end normal (Tabel 1). På Estrup var maj og juli måned meget våde med enkelte kraftige regnhændelser på op til 18 mm/dag (figur 2A) og med en månedlig nedbør, der oversteg normalen med henholdsvis 46 % og 62 % (Figur 1). Efteråret var derimod meget tørt og specielt i september var nedbøren på Silstrup og Estrup 61 % og 75 % mindre end normalen (figur 1). Disse nedbørsfordelinger adskiller sig imidlertid ikke specielt fra, hvad der - igennem de sidste 14 år - er observeret i området (data ikke vist).



Figur 1. Sammenligning mellem den aktuelle nedbør målt i monitoringsperioden apr - dec 2005 (grå søjler) og normalnedbøren (sorte søjler) på Estrup og Silstrup. Data stammer fra klimastationerne på Askov og Silstrup forsøgsstationer, der ligger ca. 3 og 0,3 km fra forsøgsmarkerne. Nedbør er korrigeret til jordoverfladen ifølge Allerup et. al. (1998).

Tabel 1 Opgørelse over akkumuleret nedbør og drænvandsafstrømning i monitoringsperioden (1/4- 30/11 2005) på Estrup og Silstrup forsøgsmarker. Normalnedbøren er vist til sammenligning.

	Silstrup	Estrup
Nedbør i monitoringsperioden ¹⁾ (mm)	437	534
Normalnedbør (1961 - 1990) (mm)	716	718
Drænvandsafstrømning (mm)	15	120

¹⁾ Nedbørsdata stammer fra klimastationerne på Askov og Silstrup forsøgsstationer, der ligger ca. 3 og 0,3 km fra forsøgsmarkerne. Nedbør er korrigeret til jordoverfladen ifølge Allerup et. al. (1998)

Udvaskning af østrogen og coliforme bakterier

De første resultater viser, at udvaskning af østrogen og coliforme bakterier fra nedfældet gylle kan være en forureningskilde for vandmiljøet. Østrogen samt coliforme bakterier blev begge udvasket fra rodzonen (dvs. udvaskning til drændybde, ca. 1 m.u.t) i koncentration der oversteg henholdsvis effektkoncentrationen og grænseværdien for drikkevand¹. Op til tre og syv måneder efter udbringning blev henholdsvis østron og coliforme bakterier fundet i høje koncentration i det afstrømmende drænvand.

Østrogen

På Estrup blev der den 19. april med gyllen nedfældet 0,4 g østrogen-ækv/ha. I de efterfølgende 9 dage faldt der ingen regn. De første nedbørshændelser i maj satte gang i drænastrømningen og forårsagede en hurtig udvaskning af østron, som blev fundet første gang 2. maj 14 dage efter udbringning (Figur 2B). Udvaskningen fortsatte sommeren igennem, hvor østron blev fundet i samtlige af de 5 analyserede prøver. Tre måneder efter udbringning blev der fundet op til 11 ng/l, hvilket er over effektgrænsen på 3 ng/l (Thorpe, et al. 2003). Stofferne 17 β -østradiol og 17 α -østradiol blev fundet i enkelte af de analyserede prøver, dog i lavere koncentrationer, der alle lå under 1 ng/l (Figur 2C-D).

På Silstrup blev der den 23. april med gyllen nedfældet 1.7 g østrogen-ækv/ha. Udbringningen blev efterfulgt af 6 tørre dage, hvorefter der i starten af maj kom nedbør. Sommeren igennem løb der ikke vand i drænene, hvorfor prøvetagning ikke var mulig. Dog blev der i forbindelse med en minimal afstrømning ultimo maj (21/5 2005) grabsamlet en vandprøve. Denne prøve indeholdt små mængder af østron (0,37 ng/l) (Figur 3B). På Silstrup er udtaget for få prøver til at foretage en vurdering. Dette kan tidligst ske, når resultater fra efterårets prøvetagning foreligger.

Der er på begge lokaliteter udtaget yderligere prøver i oktober og november måned, men disse er endnu ikke analyseret.

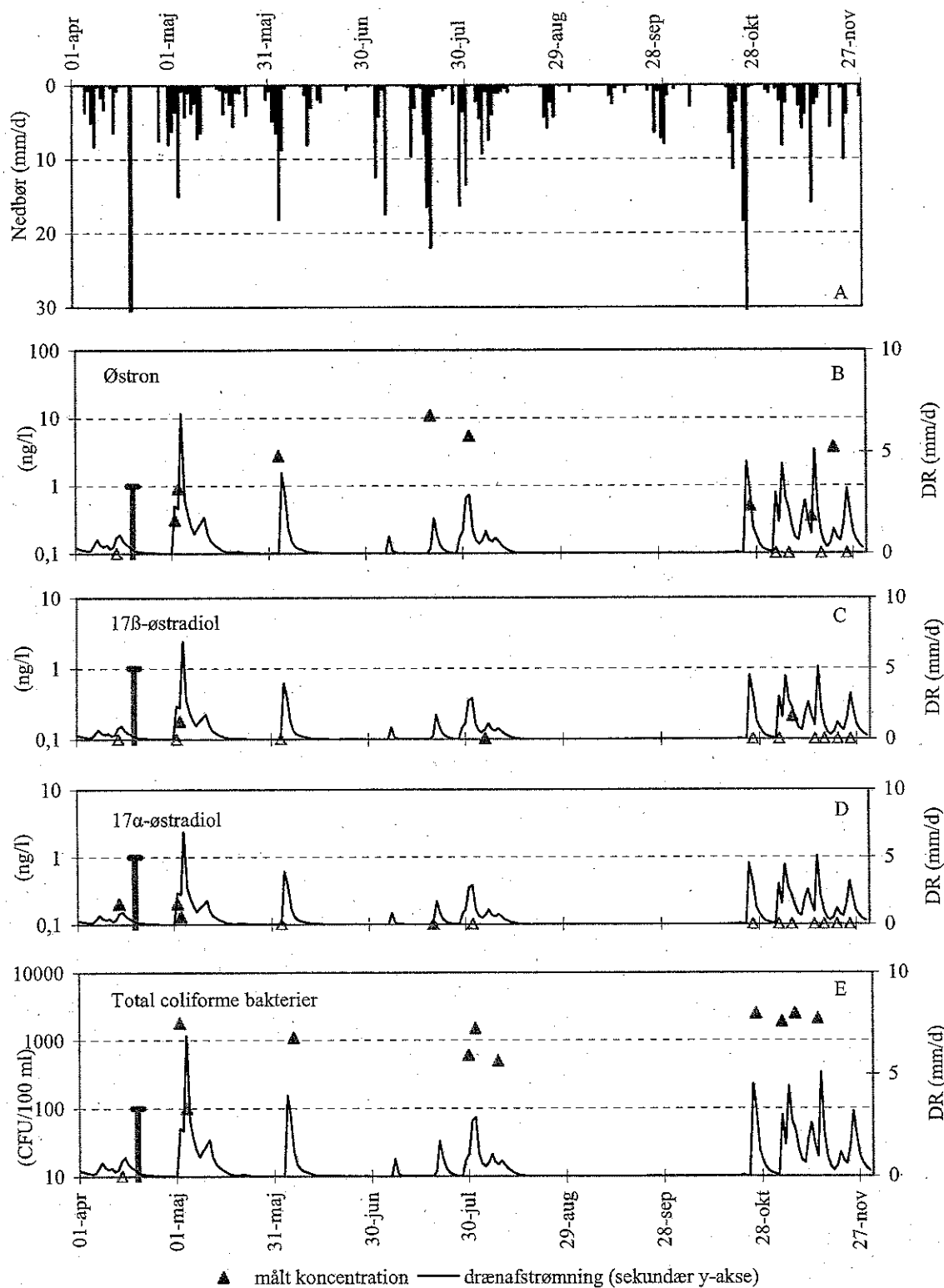
Coliforme bakterier

På ingen af markerne fandt vi coliforme bakterier eller *E.coli* i drænvandet før udbringning af gylle. Derimod fandt vi efter udbringningen af gylle, med lave niveauer af coliforme bakterier, udvaskning af disse (Figur 2E og 3E). Koncentrationsniveauet var rimelig konstant, hvilket vidner om en vedvarende udvaskning af disse indikatororganismer. Selv 7 måneder efter udbringning blev coliforme bakterier udvasket i koncentrationer omkring 1000 CFU/100 ml, hvilket er mange gange over det niveau, der tillades for drikkevand. De målte koncentrationer af coliforme indikatorbakterier har ikke i sig selv en skadelig virkning i vandløbene, hvor coliforme bakterier findes naturligt, men de er indikator bakterier, der viser en potentiel forureningsrisiko med patogene bakterier i det øverste grundvand. Udvaskning af coliforme bakterier er påvist i Storstrøms Amt, hvor coliforme bakterier er fundet i grundvand, der med sikkerhed dannes under marker samt i grundvand udtaget under andre arealer (Brüsch et al. 2005). I en tidligere undersøgelse blev coliforme bakterier også fundet i flere overfladenære drikkevandboringer, men kilder til disse forureninger kunne ikke fastslås med sikkerhed (Brüsch et al. 2004).

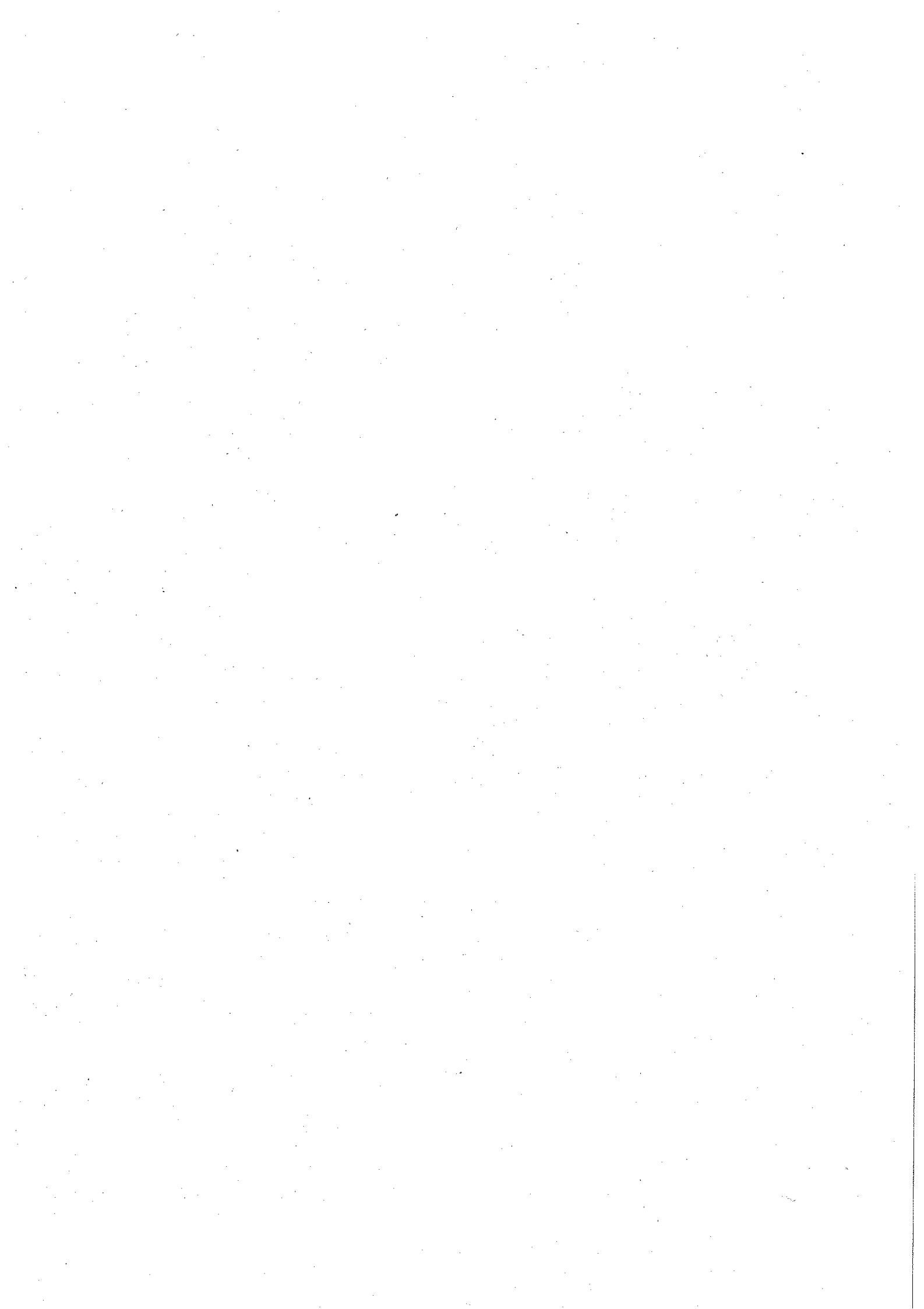
¹ Effekt koncentrationen af østron og 17 β -østradiol ligger på henholdsvis 3 og 4 ng/l (Thorpe et al. 2003; Metcalfe et al. 2001). I drikkevand må der ikke findes coliforme bakterier.

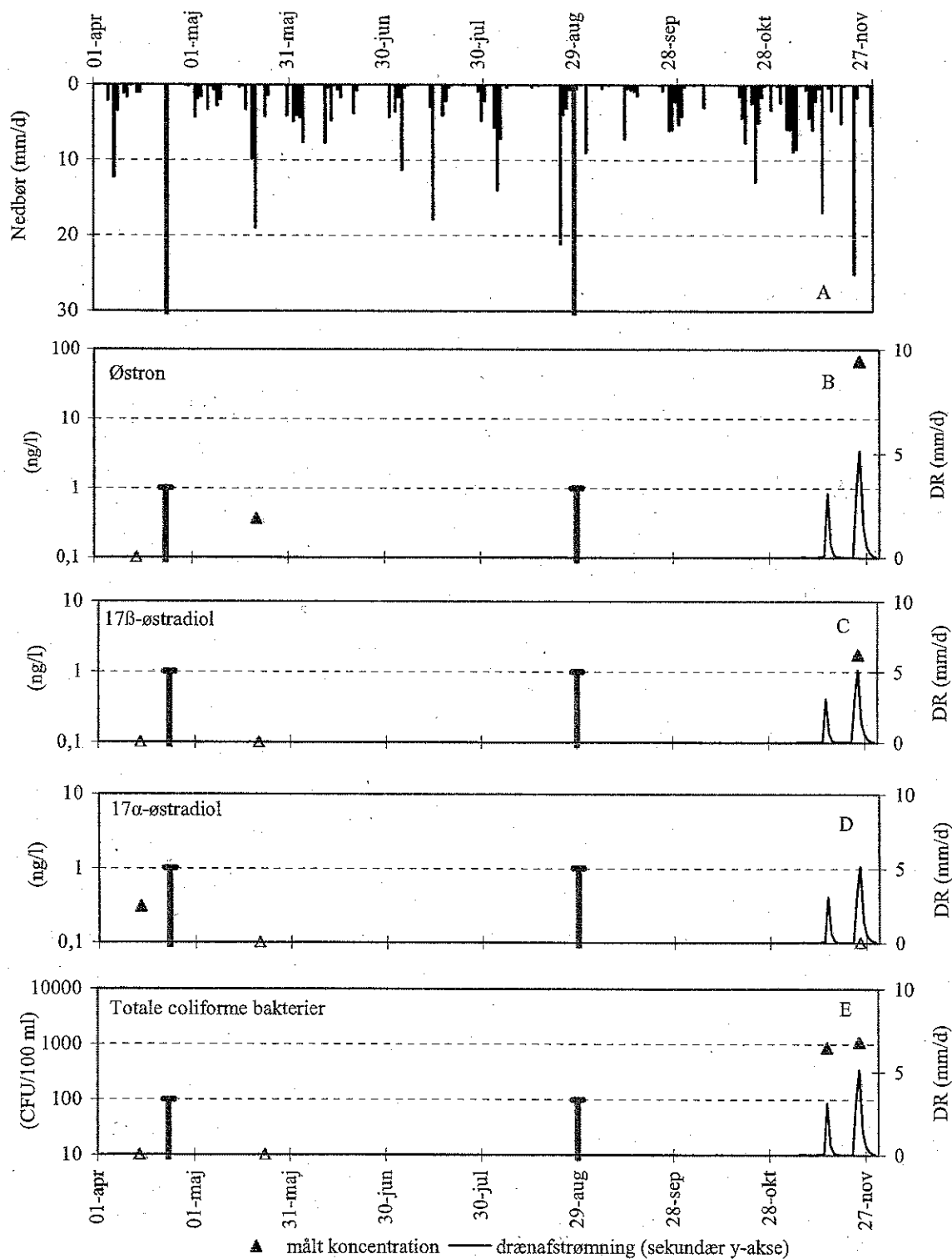
Undersøgelsen perspektiver

Det er ikke muligt, ud fra foreliggende data, at vurdere forureningsrisikoen af det dybereliggende grundvand, fordi denne undersøgelse udelukkende omfatter målinger i dræn placeret i 1 meters dybde. I og med, at stofferne og indikatorbakterierne er fundet udvasket til drændybde, hvor den mikrobiologiske nedbrydning og prædation erfaringsmæssigt er minimal, kan de dog udgøre en potentiel forureningsrisiko for de små private vandforsyninger, der typisk indvinder vand fra det allerøverste grundvand. Afklaring af forureningsrisikoen kræver dog yderligere viden om en række aspekter såsom udbredelsesmængder, omsætning og transport af de omtalte stoffer og mikroorganismer i jorden mv.

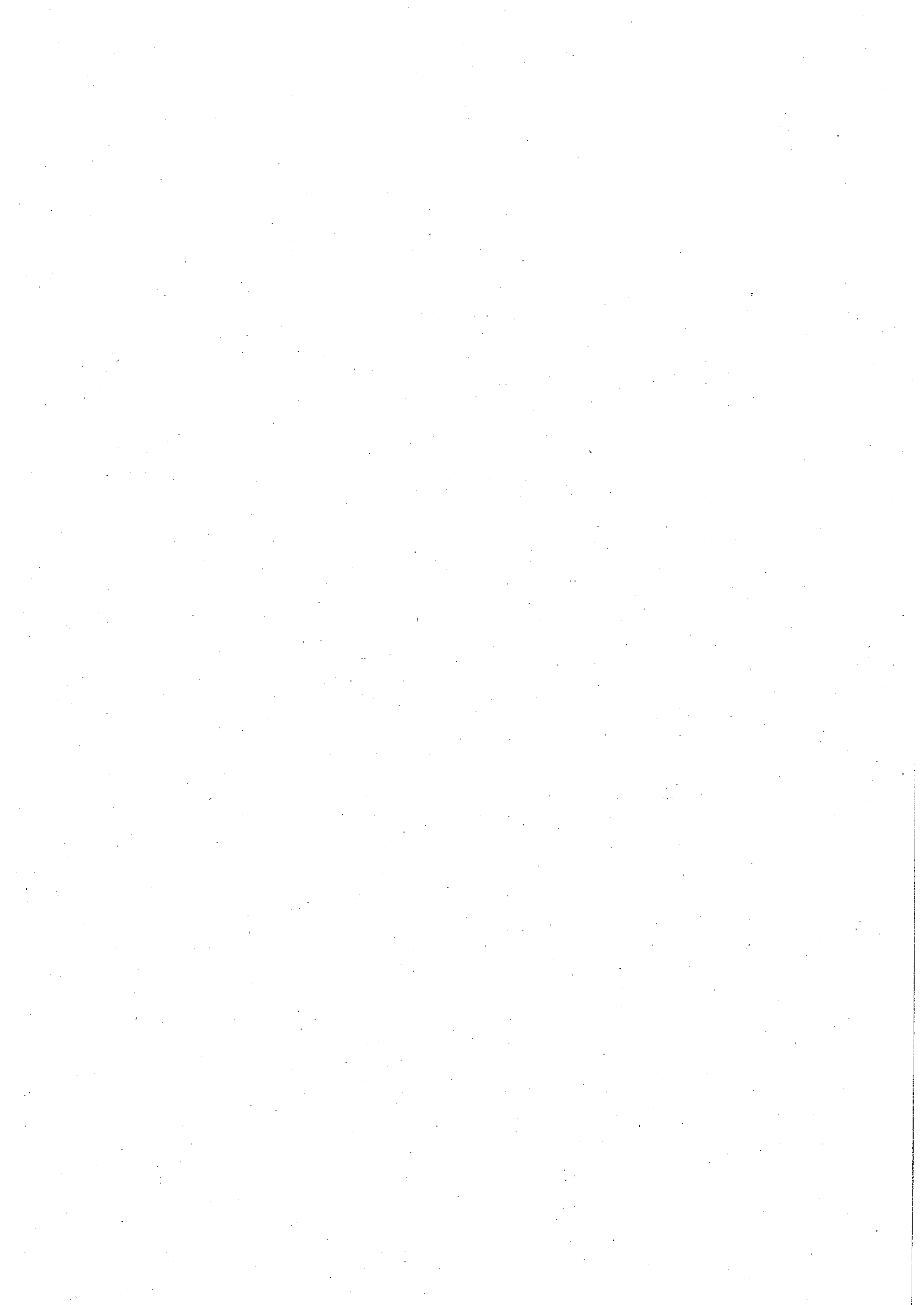


Figur 2. Nedbør (A) samt koncentrationen af østron (B), 17β -østradiol (C) 17α -østradiol (D) og totale coliforme bakterier (E) i drænvandet ved Estrup. Den daglige drænaftømning (DR) er afbilledet på den sekundære akse, og den lodrette røde lodrette streg angiver tidspunktet for gylleudbringningen. Åbne symboler indikerer, at koncentrationen var under detektionsgrænsen på 10 CFU/100 ml for coliforme bakterier og 0,1 ng/l for øvrige stoffer.





Figur 3. Nedbør (A) samt koncentrationen af østron (B), 17β-østradiol (C) 17α-østradiol (D) og totale coliforme bakterier (E) i drænvandet ved Silstrup. Den daglige drænaflow (DR) er afbilledet på den sekundære akse, og den lodrette røde lodrette streg angiver tidspunktet for gylleudbringningen. Åbne symboler indikerer, at koncentrationen var under detektionsgrænsen på 10 CFU/100 ml for coliforme bakterier og 0,1 ng/l for øvrige stoffer.



Referencer

Allerup, P. H. Madsen H. og Vejen, F. (1998): Standardværdier (1961-90) af nedbørskorrektioner, *Dansk Meteorologisk Institut, Technical report no. 98-10, København.*

Brüsch W., Stockmarr J., Platen-Hallermund F., Kelstrup N. & P. Rosenberg, 2004: Pesticidforurennet vand i små vandforsyninger. Danmarks og Grønlands Geologiske Undersøgelse rapport 2004/9.

Brüsch, W. og Rosenberg, P. (2005): Kilder til fund af glyphosat og AMPA i drikkevand fra små vandforsyningsanlæg i Storstrøms Amt. MST projekt udført for Miljøstyrelsen (MST j.nr. 7041-03354), Høringsversion foreligger.

Lindhardt, B., Abildtrup, C., Vosgerau, H., Olsen, P., Torp, S., Iversen, B.V., Jørgensen J.O., Plauborg F., Rasmussen, P. and Gravesen, P. (2001): The Danish Pesticide Leaching Assessment Program: Site characterisation and Monitoring design, Geological Survey of Denmark and Greenland, September 2001.

Jacobsen, C.S., Sørensen, S.R., Juhler, R.K., Brüsch, W. and Aamand, J (2005): Emerging contaminants in Danish groundwater. Danmarks og Grønlands Geologiske Undersøgelse Rapport 2005/49.

Kjølholt, J., Stuer-Lauridsen, F., Høiby, L.F., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F., Bach, K., Hansen, N., Hansen, N., Køppen, B., Bjerregaard, P. and Frost, B. (2005): Survey of Estrogenic Activity in the Danish Aquatic Environment. Part B: Supplementary Investigations, MST, in press.

Kjær, J., Olsen, P., Barlebo, H.C., Henriksen, T., Juhler, R.K., Plauborg, F., Grant, R. Nygaard, P. and Gudmundsson, L. (2005): The Danish Pesticide Leaching Assessment Programme: Monitoring results May 1999 – June 2004, Geological Survey of Denmark and Greenland 2001 Geological Survey of Denmark and Greenland 2005

Lægdsmand, M. and H.R. Andersen. 2005. Can steroid estrogens from slurry leach to drains and groundwater? 1 p. SETAC Europe 15th Annual Meeting, 22-26 Maj 2005. Lille, France. Abstract. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Europe.

McKay, L., Fredericia, J., Lenczewski, M., Morthorst, J. and Klint, K.E.S. (1999): Spatial variability of contaminant transport in a fractured till, Avedøre Denmark. *Nord. Hydrol.* 30,333–360

Metcalf CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, et al. 2001, Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*) *Environ Toxicol Chem*, 20:297-308

Thorpe K.L., Benstead R., Hutchinson T.H. 2003, Reproductive effects of exposure to oestrone in the fathead minnow, *Fish Physiology and Biochemistry*, 28 (1-4): 451-452 2003

Vinten, A.J.A., Lewis, D.R., Fenlon, D.R., Leach, K.A., Howard, R., Svoboda, I. and Ogden, I. (2002): Fate of *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157 in soils and drainage water following cattle slurry application at 3 sites in southern Scotland. *Soil Use and Management* 18(3), 223-231.