Roskilde University

Mikroplast i jord - Undersøgelse af langtidseffekter og undvigeadfærd hos den naturligt forekommende, endogæiske regnormeart Aporrectodea caliginosa

Palmqvist, Annemette; Sandgaard, Monica Hamann; Magid, Jakob

Publication date:
2019

Document Version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Palmqvist, A., Sandgaard, M. H., & Magid, J. (2019). *Mikroplast i jord - Undersøgelse af langtidseffekter og undvigeadfærd hos den naturligt forekommende, endogæiske regnormeart Aporrectodea caliginosa*. Roskilde Universitet.

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain.
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact rucforsk@kb.dk providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 12. Jul. 2025

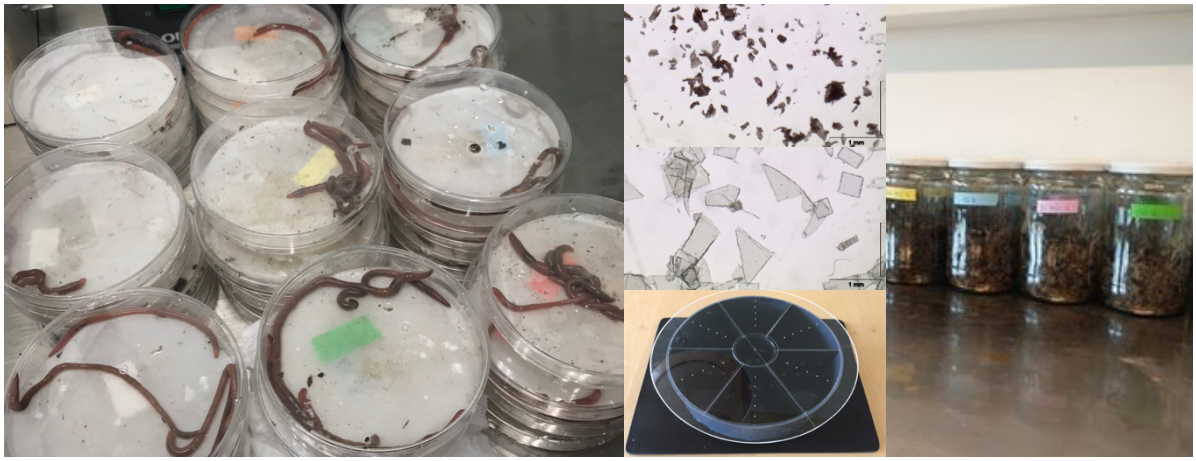
MIKROPLAST I JORD

Undersøgelse af langtidseffekter og undvigeadfærd hos den naturligt forekommende, endogæiske regnormeart *Aporrectodea caliginosa*.

Annemette Palmqvist[‡], Monica Hamann Sandgaard[‡] og Jakob Magid[#]

[‡]Institut for Naturvidenskab og Miljø, Roskilde Universitet

[#] Institut for Plante og Miljøvidenskab, Københavns Universitet



Samarbejdsprojekt mellem Roskilde Universitet, Cirkulær økonomi og affald, Miljøstyrelsen, og Brancheforeningen Genanvend Biomasse, med bidrag fra Københavns Universitet og projektets følgegruppe.

KØBENHAVNS UNIVERSITET

Titel: Mikroplast i jord: Undersøgelser af langtidseffekter og undvigeadfærd hos den naturligt forekommende, endogæiske regnormeart *Aporrectodea caliginosa*.

Redaktion: RUC, KU, Genanvend Biomasse samt Følgegruppen

Illustrationer: Annemette Palmqvist & Monica Hamann Sandgaard

Forside illustration: Billeder af forsøgsopstillinger, mikroplast og *Aporrectodea caliginosa*

År: 2019

Spørgsmål vedr. projektet: kontakt Annemette Palmqvist, Apalm@ruc.dk, Institut for Naturvidenskab & Miljø, Roskilde Universitet

Må citeres med korrekt kildeangivelse

Projektets følgegruppe består af følgende virksomheder/organisationer, der alle har bidraget til projektet: Biofos, DANVA, Genanvend Biomasse, HedeDanmark, Hedensted Spildevand, Mijodan, Miljøstyrelsen, Novafos, Rambøll

INDHOLDSFORTEGNELSE

1. Abstract 4

2. Resume 5

3. Indledning 5

4. Baggrund for projektet 7

5. Formål 7

6. Metoder 7

6.1 Indsamling af jord og forsøgsorganismer 7

6.2 Karakterisering af jord 9

6.3 Fremstilling og karakterisering af mikroplast 11

6.4 Langtidsforsøg (12 uger) 11

6.5 Undvigeforsøg 13

6.6 Statistik 14

7 Resultater og diskussion 14

7.1 Karakterisering af jord og tilsat mikroplastik 14

7.2 Langtidsforsøg 17

7.3 Undvigeadfærd 20

8 Hovedkonklusioner 21

9 Referencer 22

10 Bilag 24

Bilag 1: Forklaring af forkortelser, definitioner og begreber 24

Bilag 2: Statistik på jordkarakterisering 25

Bilag 3: Kritiske spørgsmål og svar om mikroplast i biogødning og anden affaldsbiomasse til jordbrugsformål 26

1. ABSTRACT

This project was a collaborative project between Roskilde University, the Danish EPA and a consortium of stakeholders coordinated by the Danish Biomass Recycling Association. The project was established based on a common wish, from the project partners and Department of Plant and Environmental Sciences at Copenhagen University, for increasing scientific knowledge on how and to what degree important soil associated organisms may be affected by microplastic particles accumulated in agricultural soil through recycling of organic resources as fertilizers.

The overall aim of the project was to examine if the use of organic waste (sewage sludge and composted organic household waste), as fertilizers, affect behavior, survival, growth and reproduction in earthworms; and specifically, if microplastic particles in the fertilizers has a measurable effect on the earthworms. The research question was addressed through two types of experiments: 1) A long-term exposure-study over 12 weeks, where survival, growth, burrowing behavior and reproduction in the grey worm (*Aporrectodea caliginosa*) was examined, and 2) A number of avoidance experiments with *A. caliginosa* and/or the compost worm *Eisenia veneta*, where the worms' avoidance behavior was examined by registering their choices when provided the possibility to choose between 2-3 different soil-types.

Overall, none of the tested treatments (soil/fertilizer types or added microplastic) resulted in negative effects on survival, growth or reproduction of *A. caliginosa*. Both long-term and avoidance experiments indicated that some fertilizers, e.g., composted household waste and sewage sludge, improve living conditions for the common earthworm species *A. caliginosa*, probably due to the content and type of organic material in the fertilizers. The avoidance experiments showed that if food quality is the same in the tested soils, the compost worm *E. veneta* can detect and avoid added microplastic (in a concentration of 0.1% on a weight-basis). However, the experiments also indicated that the two tested earthworm species' choice of habitat is generally driven by food-availability and -quality rather than the prevalence of physical contaminants, in the form of microplastic, in the soil. Likewise, a similar 12-week exposure study on the compost worm *E. veneta*, which was carried out at Roskilde University as part of a MSc thesis project (Karling 2018), showed no long-term effects of microplastic in organic resources used as fertilizers, and in addition a study of microplastic effects on *Eisenia andrei* (Rodriguez-Seijo et al, 2017) support the findings of both of these studies. Together these studies provide the first steps towards understanding potential environmental consequences of fertilizing agricultural soils with organic fertilizers containing microplastics. Based on these projects alone, there is no indication that microplastic present in organic resources pose a risk to earthworm populations when organic resources are used as fertilizers on agricultural soils. On the other hand, a Dutch study from 2016 (Lwanga et al, 2016) did show negative effects on the survival and growth, but not reproduction, of another earthworm species (*Lumbricus terrestris*) during 60 days of exposure to microplastic through food. The earthworm species used in this study has a feeding strategy that is completely different from the two species used in the present study and the earlier MSc thesis study, which may be part of the reason for the observed differences. However, the exposure concentrations in the Lwanga et al (2016) study were also considerably higher than in the present study, and this is probably the main reason for the different outcomes of the studies. The study on *E. andrei* by Rodriguez-Seijo et al (2017) did show histopathological effects in the guts of the tested earthworms, starting at a soil concentration of approximately 0.01% (on weight basis), which indicates that the presence of microplastic in soil can be a stress-factor for the worms even if it does not translate into effects at the organism level.

Although earthworms are considered to be one of the most important groups of soil macroinvertebrates, in relation to degradation of organic material and the conditioning of soils, it would be relevant to perform similar experiments with other groups of terrestrial invertebrates, for example collembolans or isopods, to examine if these are at risk from microplastic when organic resources are recycled as fertilizers on agricultural land.

2. RESUME

Projektet var et samarbejdsprojekt mellem Roskilde Universitet, Miljøstyrelsen og et konsortium koordineret af Brancheforeningen Genanvend Biomasse. Det blev etableret på baggrund af et fælles ønske fra projektparterne og Institut for Plante- og miljøvidenskab på Københavns Universitet om at opnå mere viden om, hvorvidt vigtige jordbundsorganismer påvirkes af mikroplast i det omfang mikroplastpartikler kan forventes at ophobes i jorden ved genanvendelse af organiske ressourcer til jordforbedring. Formålet med projektet var således at undersøge om anvendelse af organiske affaldsressourcer (slam fra spildevandsrensning og komposteret husholdningsaffald) som gødning påvirker adfærd, overlevelse, vækst og reproduktion hos regnorm; herunder specifikt om mikroplast i gødningen har en effekt på ormene. Spørgsmålet blev adresseret gennem to typer af forsøg med regnorm: 1) Et langtids eksponeringsforsøg over 12 uger, hvor overlevelse, vækst, nedgravningsadfærd og reproduktion hos den Grå orm (*Aporrectodea caliginosa*) blev undersøgt, og 2) et antal undvigeforsøg med *A. caliginosa* og/eller kompostormen *Eisenia veneta*, hvor ormenes undvige adfærd blev undersøgt gennem registrering af deres valg mellem 2-3 forskellige jordtyper. Overordnet set var der ingen negative effekter på overlevelse, vækst eller reproduktion hos *A. caliginosa* af mikroplastik i de testede behandlinger. Både langtidseksponerings- og undvigeforsøgene indikerede, at nogle gødningsformer, f.eks. komposteret husholdningsaffald og spildevandsslam, giver bedre forhold for den almindeligt forekommende *A. caliginosa*, sandsynligvis på grund af indholdet og typen af organisk materiale. Undvigeforsøgene viste, at hvis fødekvaliteten i jorden er den samme, så kan *E. veneta* detektere og vælge at undvige tilsat mikroplast (i en koncentration på 0,1% per vægtbasis), men forsøgene indikerede også, at de to regnorme arters valg af habitat generelt er drevet af fødetilgængelighed og -kvalitet og i mindre grad af forekomsten af fysiske urenheder i jorden i form af mikroplast. Et lignende 12 ugers eksponeringsstudium på kompostorm af arten *E. veneta*, som blev udført som en del af et specialeprojekt på Roskilde Universitet (Karling 2018), indikerede ligeledes at der ikke er langtidseffekter på regnorm af mikroplast i organiske ressourcer, ligesom et studium af mikroplast effekter på *Eisenia andrei* (Rodriguez-Seijo et al, 2017) understøtter disse to studier. Disse studier er de første skridt henimod at forstå eventuelle miljømæssige konsekvenser af udbringning af organiske ressourcer, indeholdende mikroplast, på landbrugsjord, og med udgangspunkt i disse projekter alene er der ikke umiddelbart noget der tyder på, at mikroplast i organiske ressourcer udgør en risiko for regnormebestanden når organiske ressourcer anvendes til gødning på landbrugsjord. Et hollandsk studium fra 2016 (Lwanga et al. 2016) viste dog en negativ påvirkning på overlevelse og vækst, men ikke reproduktion, hos en anden regnormeart ved 60 dages eksponering for mikroplast gennem føden. Den pågældende regnormeart har en helt forskellig fødesøgningsstrategi fra de to arter der blev undersøgt i dette og det tidligere specialestudium fra Roskilde Universitet, og eksponeringsvejen var anderledes, og det kan ikke afvises at det er årsagen til at resultaterne af undersøgelserne er så forskellige. Desuden var eksponeringskoncentrationerne i Lwanga et al (2016) studiet højere end i dette studium, hvilket sandsynligvis er den primære årsag til de forskellige resultater. Studiet af Rodrigez-Seijo et al (2017) påviste dog også histopatologiske effekter i ormenes tarme helt ned til en mikroplast koncentration på ca. 0,01%, hvilket indikerer at tilstedeværelsen af mikroplast kan være en stressfaktor for ormene, selv om den ikke udmønter sig i effekter på individ niveau. Selv om regnorme regnes for at være en af de vigtigste makroinvertebrat grupper i forhold til nedbrydning af organisk materiale og konditionering af jorden, vil det være relevant at foretage lignende forsøg med andre grupper af organismer, f.eks. springhaler eller isopoder for at undersøge om disse grupper er i risiko fra mikroplast i organiske ressourcer, som anvendes til gødning på landbrugsjord.

3. INDLEDNING

Mens problemer relateret til plastforurening i det akvatiske miljø, og i særlig grad havmiljøet, har være kendt og italesat helt tilbage til 1970'erne, og i de senere år har fået tiltagende offentlig, politisk og forskningsmæssig opmærksomhed både nationalt og internationalt, findes der kun ganske få studier af forekomst og effekt af mikroplast i det terrestriske miljø. Som pointeret af Rillig (2012) og Rillig et al (2017) er det sandsynligt at mikroplast vil tilføres det terrestriske miljø fra forskellige kilder, heriblandt landbrugsplast og spildevandsslam, og der er derfor behov for at undersøge både

forekomst, skæbne og mulige effekter af mikroplast i det terrestriske miljø. Tilbage i 2005 blev der publiceret en enkelte undersøgelse af mikroplast i det terrestriske miljø (Zubris & Richards, 2005), men formålet med dette studium var dog ikke at undersøge mulige påvirkninger af mikroplast på miljøet. Derimod, havde studiet fokus på at påvise at syntetiske fibre kunne anvendes som en sikker indikator på, at der tidligere havde været tilført spildevandsslam til jorden (som gødning eller i forbindelse med deponi af spildevandsslam). Studiet af Zubris & Richards (2005) byggede ovenpå et tidligere studium (Habib et al., 1998), hvori det blev sandsynliggjort at fundet af syntetiske fibre (mikroplast) i gødningsprodukter kunne anvendes som indikation på tilstedeværelsen af spildevandsslam. Zubris & Richards (2005) påviste med deres jordanalyser at forøgede niveauer af syntetiske fibre kan genfindes i jorden i mere end 5 år efter, at udbringning af gødningsprodukter, baseret på spildevandsslam, er stoppet, hvilket er i tråd med den generelle opfattelse af, at plastik nedbrydes langsomt i miljøet. Der er dog ikke nogen indikation, i den publicerede litteratur, på hvor lang nedbrydningstiden af plastik i det terrestriske miljø kan antages at være.

En række studier har i de senere år bidraget til større viden om omfanget af mikroplast i organiske ressourcer som spildevandsslam (Mintenig et al, 2014; Magnussen & Norén, 2014; Vollertsen & Hansen, 2017; Palmqvist & Aagaard Larsen, 2018; Ljung et al, 2018) og kildesorteret organisk husholdningsaffald (Weithmann et al, 2018; Lundbøl Vestergaard et al, 2018). Disse fastslår alle at der kan forventes at være ikke ubetydelige mængder af mikroplast i organiske ressourcer, som vil tilføres det terrestriske miljø, hvis ressourcerne anvendes som gødning på landbrugsjord. Viden om den reelle forekomst af mikroplast i landbrugsjord, gødet med organiske ressourcer, er dog begrænset til to mindre undersøgelser som en del af større studier (Vollertsen & Hansen, 2017; Ljung et al, 2018), som indikerer at niveauet typisk må forventes at være lavere end 50 mg mikroplast/kg jord, ved almindelig anvendelse af f.eks. spildevandsslam til jordbrugsformål.

Det er relevant at spørge om mikroplast forekomster på dette niveau vil have negative effekter på vigtige jordbundsorganismer, og det er netop det spørgsmål, der adresseres i dette projekt. Ved projektets start var der endnu kun et publiceret studium af effekter af mikroplast på en relevant jordbundsorganisme, nemlig regnormen *Lumbricus terrestris* (Lwange et al., 2016). Siden er der publiceret endnu et studium på en anden regnormeart, *Eisenia andrei* (Rodriguez-Seijo et al., 2017), og begge studier viser at effekter først opstår hos de testede regnormearter ved mikroplast koncentrationer i ormenes føde, som er højere end de koncentrationer Vollertsen & Hansen (2017) og Ljung et al (2018) fandt i den jord de analyserede i deres studier.

Regnorme er relevante testorganismer til undersøgelse af potentielle økologiske effekter af mikroplast i organiske ressourcer og jord, idet de med deres aktivitet bidrager både til nedbrydning af organisk materiale og til den generelle konditionering af jorden (Bart et al, 2018 og referencer heri). F.eks. afgiver ormene slim, når de arbejder sig gennem jordmatricen, og slimen kitter jordpartikler sammen og bidrager dermed til forbedring af jordens krummestruktur. Regnorm er således en forudsætning for optimal plantevækst i landbrugsjord. Regnorme kan inddeles i tre grupper: 1) regnorme som lever i og af førnelaget på jordoverfladen i organisk rige miljøer som f.eks. skove (epigeic), 2) regnorme som graver dybe, typisk permanente, vertikale gange og primært lever af plantemateriale i førnelaget på jordoverfladen (Anecic), og 3) regnorme som graver horisontale gange i de øverste 10-20 cm af jorden, og lever af det organiske indhold i den jord de indtager (endogeic). Regnorme fra de tre grupper vil typisk have forskelligt levested, levevis og fødesøgningsstrategi, hvilket betyder at de også vil have forskellig relevans for jordkonditionering og omsætning af organisk materiale på landbrugsjord. Den Grå orm (*Aporrectodea caliginosa*) er et eksempel på en endogeic regnorm, og en af de mest almindeligt forekommende regnormearter på landbrugsjord i tempererede egne (Bart et al, 2018) inklusiv i Danmark. Det er årsagen til, at netop denne art blev valgt til dette studium.

Frem for alene at undersøge effekter af mikroplast, som er kunstigt fremstillet og tilsat (spiket) til jord i laboratoriet, blev det valgt at benytte jord fra forsøgsarealet kaldet 'CRUCIAL marken'. CRUCIAL marken er et fastliggende forsøg med affaldstyper som f.eks.: spildevandsslam, bioforgasset og komposteret husholdningsaffald og human urin, som blev etableret af Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet i 2003. Da viden om eventuelle langsigtede effekter af anvendelse af affaldsbiomasse er mangelfuld, først og fremmest fordi det kræver længevarende forsøg

(typisk over 10-20 år) under markforhold at kunne konkludere med en rimelig videnskabelig sikkerhed, er CRUCIAL forsøgets formål at skabe grundlag for at vi nu og i fremtiden vil kunne vurdere de langsigtede virkninger af anvendelse af byernes affaldsstoffer til jordbrugsformål på miljø, jordkvalitet, dyr og menneskers sundhed. Forsøgsarealet blev oprettet med støtte fra Forskningscenter for Økologisk Jordbrug (FØJO), men drives nu på en kombination af basismidler og bidrag fra samarbejdspartnere og interessenter. Forsøget er etableret på KU's forsøgsgårde ved Taastrup på en JB5 lerjord. Det består af 39 parceller á 891 m^2. Hver parcel er adskilt af 3 meter brede græsgange, som sikrer at der ikke flyttes jord fra en parcel til den næste under mark operationer. I 2002 blev der sået vårhvede med undersået hvidkløver i alle behandlinger undtagen den ugødede. I de følgende år blev der anvendt vårkorn af havre, byg, hvede eller raps undtagen i årene 2010 og 2011 hvor der blev sået rajgræs (2010) og vinterhvede (2011) om efteråret. Hvidkløver var fortsat undersået frem til 2009. På dette tidspunkt blev ukrudtshåndteringen så krævende at der blev påbegyndt herbicidbehandlinger. Efterfølgende er hvidkløver alene blevet undersået i en særlig behandling som ellers er ugødet, men som ikke har relevans for dette forsøg.

Da der på verdensplan kun er gennemført ganske få længerevarende (>5 år) forsøg med vedvarende tilførsel af affaldsbiomasse til dyrket jord, giver forsøgsarealet en unik mulighed for at undersøge forekomst og effekter af mikroplast tilført med organiske ressourcer (affaldsbiomasse) til det terrestriske miljø.

4. BAGGRUND FOR PROJEKTET

Etablering af projektet var drevet af et fælles ønske fra projektparterne og Københavns Universitet om at opnå mere viden om potentielle effekter på relevante jordbundorganismer af mikroplast i organiske ressourcer. Projektet er et samarbejdsprojekt mellem Institut for Naturvidenskab og Miljø på Roskilde Universitet, Brancheforeningen Genanvend Biomasse og Cirkulær økonomi og affald, Miljøstyrelsen. Forud for projektstart etableredes en følgegruppe, som blev inddraget både i forbindelse med forberedelserne af forsøget og undervejs i forsøget. Projektet blev financieret af Miljøstyrelsen og et konsortium bestående af Genanvend Biomasse, Biofos, DANVA, HedeDanmark, Hedensted Spildevand, Mijodan, Novafos og Rambøll.

Roskilde Universitet har stået for planlægningen og den praktiske udførelse af eksponeringsforsøgene, dataanalyse og sammenfatning af resultaterne. Københavns Universitet, Institut for Plantevidenskab og Miljø har bidraget til projektet dels ved at stille CRUCIAL forsøgsmarken til rådighed for indsamling af regnorme af arten *Aporrectodea calliginosa* (grå orm) og jord til eksponering af ormene, og dels med viden om behandlinger på og drift af forsøgsmarken.

5. FORMÅL

Formålet med projektet var at undersøge om anvendelse af organiske affaldsressourcer (spildevandsslam og komposteret husholdningsaffald) som gødning påvirker adfærd, overlevelse, vækst og reproduktion hos regnorm; herunder specifikt om mikroplast i gødningen har en effekt på ormene.

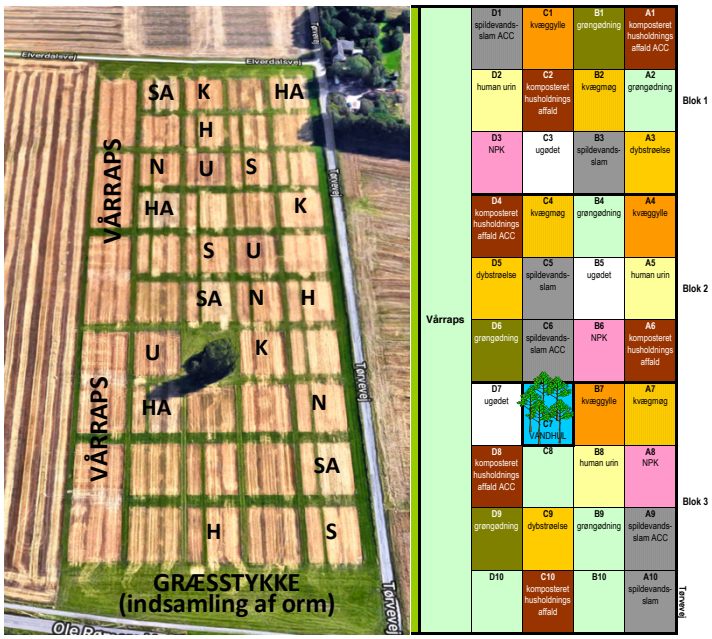
6. METODER

For at adressere formålet blev der udført to sæt forsøg: 1) et langtidsforsøg, hvor regnorm af arten *A. caliginosa* blev eksponeret til forskellige jordtyper over 12 uger, og 2) et antal undvige forsøg, med enten *A. caliginosa* eller *Eisenia veneta* (kompostorm), hvor ormenes valg mellem 2 eller 3 forskellige jordtyper blev registreret. Forsøgsmetoder og målinger er beskrevet med flere detaljer nedenfor.

6.1 INDSAMLING AF JORD OG FORSØGSORGANISMER

Jord og regneorme af arten *Aporrectodea caliginosa* til både langtids- og undvigeforsøg blev indsamlet på CRUCIAL forsøgsmarken i Taastrup (figur 1).

Jord til anvendelse i forsøgene (fra behandlingerne: Ugødet, NPK gødet, Kvægmøg, Spildevandsslam, Spildevandsslam accelereret, Komposteret husholdningsaffald og Komposteret husholdningsaffald accelereret – se endvidere nedenfor) blev indsamlet fra parcellen med hver af de pågældende behandlinger i hver af de tre blokke (figur 1, luftfoto; 21 parceller i alt). Fordelt på 4 forskellige områder indenfor hver parcel blev i alt 10-12 L jord per parcel indsamlet ved at grave de øverste 10-20 cm af jordoverfladen. Efterfølgende blev de tre prøver fra hver behandling omhyggeligt blandet sammen behandlingsvist. Ved ankomsten til laboratoriet på Roskilde Universitet blev jorden tørsigtet på en 8 mm sigte for at fjerne større elementer såsom sten, plantedele og større dyr, uden at ødelægge jordens krummestruktur eller sigte mikroplast fra. Jord til akklimatisering af ormene forud for forsøgene blev indsamlet på græsstykket foran forsøgsparcellerne (figur 1, luftfoto), og blev ligeledes tørsigtet på 8 mm sigte.



Figur 1. Luftfoto af og behandlingsoversigt for CRUCIAL forsøgsmarken, hvorfra jord og regnorme af arten *Aporrectodea caliginosa* (Grå orm) blev indsamlet til forsøgene. Forkortelser for gødningstyper indsat på luftfoto: H, komposteret **h**usholdningsaffald; HA, komposteret **h**usholdningsaffald **a**ccelereret niveau; S, spildevands**s**lam; SA, spildevands**s**lam **a**ccelereret niveau; N, **N**PK gødning; K, **k**vægmøg; U, **u**gødet.

De udvalgte behandlinger fra CRUCIAL marken bestod af tre (negative) kontrolbehandlinger, nemlig ugødet, NPK gødet og Kvægmøgsgødet jord, som alle formodes at have relativt lavt indhold af mikroplast. Behandlingen ugødet har siden forsøgets start været dyrket helt ugødet og uden hvidkløver undersået, men har ellers fulgt det generelle sædskifte på marken. NPK gødet jord har været gødet med en moderat mængde NPK 21-3-10 svarende til ca. 100 kg N ha^{-1} $år^{-1}$, og har haft hvidkløver undersået. Til parcellerne gødet med kvægmøg, er der leveret konventionelt kvægmøg (fra Hedehusene), som er udbragt i overdosering for at have en behandling med høj tilførsel af organisk materiale. På disse parceller er der udbragt kvægmøg svarende til en N norm på 450 kg N ha^{-1} $år^{-1}$, og der har været undersået med hvidkløver.

De tre kontrolbehandlinger er benyttet som sammenligningsgrundlag for fire behandlinger, hvor mikroplast indholdet formodes at være relativt højt, nemlig jord gødet med spildevandsslam i to niveauer (spildevandsslam og spildevandsslam accelereret) og jord gødet med komposteret kildesorteret organisk husholdningsaffald i to niveauer (komposteret husholdningsaffald og komposteret husholdningsaffald accelereret). Alle disse behandlinger har været dyrket med hvidkløver undersået. Spildevandsslammet er gennem perioden leveret fra Avedøre rensningsanlæg (Biofos), som modtager spildevand fra industri og 0,3 mio indbyggere i Københavnsområdet. Slammet er fældet med $Fe(III)ClSO_4$, afgasset og afvandet, inden det er blevet bragt ud på marken. Spildevandsslammet er som ovenfor nævnt tilført i to niveauer, hvor det såkaldte normalniveau svarer til 150 kg N ha^{-1} $år^{-1}$, mens det accelererede niveau svarer til 450 kg N ha^{-1} $år^{-1}$. Begge behandlinger med spildevandsslam afviger fra gældende lovgivning for tildeling af anden organisk gødningstype, ifølge hvilken, tilførsel af slammet skal overholde et fosforloft på 30 kg P ha^{-1} $år^{-1}$ (Fosforloftet blev indført i 2017. Jf. i øvrigt seneste bekendtgørelse om miljøregulering af dyrehold og om opbevaring og anvendelse af gødning; BEK 722, 2019, §37 stk. 5). Der er således udbragt væsentligt mere gødning end tilladt, med det formål at se hvor galt det eventuelt kan gå i et ekstremt worst-case scenarie. Komposteret organisk husholdningsaffald er leveret

fra Biovækst, som modtager kildesorteret husholdningsaffald fra en række vestegns kommuner. Dette er blandet med have- og park affald, og behandlet med AIKAN teknologien. Ved brug af denne teknologi sker der først en mikrobiel udvinding af organisk stof, som bruges til biogas produktion, hvorefter restaffaldet, som er tilbage efter biogasudvindingen, udsættes for aktiv beluftning, og der sker en kompostering. På samme vis som for spildevandsslammet er der gennem perioden tilført gødning svarende til 150 kg N ha^{-1} $år^{-1}$ i normal niveauet, mens tilførslen har været svarende til 450 kg N ha^{-1} $år^{-1}$ i det accelererede niveau. Også her afviger begge niveauer fra gældende lovgivning, idet er er tilført mere materiale/gødning end der burde baseret på fosfor ækvivalenter.

Regnorme (*A. caliginosa*) blev indsamlet på græsstykket foran forsøgsparcellerne på CRUCIAL marken. Indsamling foregik enten ved anvendelse af en Allyl isothiocyanat (AITC) opløsning, bestående af AITC, isopropanol og vand, til at drive ormene op af jorden, eller ved at grave ormene op uden brug af kemikalier til at drive dem frem. Ved anvendelse af AITC metoden, blev AITC blandingen hældt ud over et jordstykke af 2 omgange. De regnorme, som AITC-opløsningen drev op af jorden, blev hurtigt skyllet i demineraliseret vand og med det samme overført til en beholder med ren jord, og først sorteret efterfølgende i laboratoriet. Ved ankomsten til Roskilde Universitet blev ormene overført til en kultiveringsjord, bestående af jord fra græsstykket foran forsøgsparcellerne blandet med sphagnum i forholdet 2:1, og akklimatiseret til laboratorie-forhold ved 20 $\pm$ 2 °C i minimum to uger, inden de blev anvendt til forsøg. Ormene blev fodret ugentligt med tørret og sigtet (2 mm) hestemøg fra umedicinerede heste.

Til et antal af undvige forsøgene anvendtes kompostorm af arten *Eisenia veneta*, som blev indkøbt fra firmaet ormeposten.dk. Forud for forsøgene blev alle kompostorm akklimatiseret til laboratorieforhold i mindst to uger. Ormene blev ligesom *A. caliginosa* akklimatiseret i en 2:1 blanding af jord fra forsøgsmarken og sphagnum ved 20 $\pm$ 2 °C i mindst 14 dage forud for forsøgene og fodret ugentligt med tørret og sigtet hestemøg fra umedicinerede heste.

6.2 KARAKTERISERING AF JORD

Forud for forsøgene blev jordparametrene, pH, total organisk materiale (TOM), total carbon (CHN), total nitrogen (CHN), vandbæreevne (Water holding capacity; WHC) og partikelstørrelse, målt. Desuden blev koncentrationen af kobber, zink, krom, nikkel, cadmium, bly og sølv målt i de forskellige jordbehandlinger. Alle metalkoncentrationer og jordparametre, undtagen partikelstørrelse, blev målt på triplikate jordprøver.

6.2.1 MÅLING AF pH

Jord-pH blev målt i henhold til OECD (2004) på lufttørrede prøver. Jorden blev lufttørret i ca. 24 timer, hvorefter ca. 10 g jord blev afvejet til et 50 ml plastikrør, der blev fyldt op til 50 ml med 0,01 M $CaCl_2$ opløsning. Prøven blev først rystet omhyggeligt med håndkraft og derefter på rystebord i 5 min, og blev efterfølgende efterladt i ro i 6 timer for at jordpartiklerne kunne sedimentere. Herefter blev pH målt med et pH-meter i den overliggende vandfase.

6.2.2 MÅLING AF TOTAL ORGANISK MATERIALE (TOM)

Indholdet af totalt organisk materiale blev målt som askefri tørvægt, ved afbrænding af jordprøver fra hver behandling i muffelovn ved 550 °C. Til hver analyse afvejedes 2,5-6 g våd jord i en forvejet muflet digle (afbrændt ved 550 °C i ca. 2 timer). Digle og jord blev tørret ved 105 °C i ca. 24 timer og efterfølgende afkølet i eksikator og vejet. Digle og jord blev derefter afbrændt ved 550 °C i 2 timer, afkølet i eksikator og vejet. Total organisk materiale blev beregnet som differencen mellem tørvægt og askefri tørvægt og angivet som procent af tørvægten.

6.2.3 MÅLING AF TOTAL NITROGEN OG CARBON (CHN)

Til bestemmelse af C, H og N-indhold blev jord udtaget i triplikat fra hver behandling og tørret ved 105 °C i 24 timer. Herefter blev en delprøve (ca. 3 mg) af hver af de tørrede prøver afvejet i en tin-kapsel på 5*9 mm. Kapslen blev med pincet lukket sammen til en lille kugle, og CHN-indholdet blev herefter bestemt ved afbrænding i en NCS-analysator (Thermo Scientific, Flash 2000). Størrelsen på toppene i det resulterende kromatogram omregnedes automatisk til det procentvise indhold af total carbon og total nitrogen ved kalibrering til en Methionin standardkurve.

6.2.4 MÅLING AF VANDBÆREEVNE (WHC)

Vandbæreevnen blev målt for hver behandling i hht. OECD (2004). Der blev afvejet 5 g våd jord til et forvejet Auger-rør, hvor bunden var dækket med et stykke filterpapir holdt på plads med en elastik. Røret med jord blev herefter nedsænket i vand indtil vandoverfladen var over jordoverfladen i røret. Efter ca. 24 timer i vand, blev røret placeret med filterpapiret mod en våd sand overflade i 2 timer for af dræne overskydende vand fra den våde jord. Dræningen foregik i en lukket beholder for at reducere fordampning fra røret. Til sidst blev røret vejet med den våde jord (vådvægten af jorden ved vandmætning), tørret ved 105 °C i 24 timer og vejet igen for at bestemme tørvægten af jorden. Vandbæreevnen blev beregnet som vandindholdet (ved vandmætning) som procent af tørvægten.

6.2.5 MÅLING AF PARTIKELSTØRRELSES FORDELING

Fordelingen af jordpartikler på sand (0,05-2 mm), silt (0,002-0,05 mm) og ler (<0,002 mm) blev bestemt ved en hydrometeranalyse også kaldet en slemmeanalyse. Forud for slemmeanalysen blev jorden grovsigtet på en 2 mm sigte, og den grove fraktion blev vejet. Til måling af partikelstørrelse i den fine fraktion (<2 mm) afvejedes ca. 50 g vådvægt jord fra hver behandling (kun en bestemmelse per behandling). Den afvejede prøve blev overført til en 250 ml Blue cap flaske sammen med 75 ml 0,1 M Natriumpyrofosfat decahydrat ($Na_4P_2O_7$*$10H_2O$) og rystet på rystebord i 24 timer, for at adskille jordpartiklerne. Herefter blev jordsuspensionen overført til en 1000 ml sedimenterings cylinder (måleglas), og der blev tilført demineraliseret vand op til 1000ml. Cylinderne med jordsuspensionerne blev sat i et vandbad ved 20 °C for at kontrollere temperaturen, som dog også blev målt ved hver densitetsmåling, så målingen kunne korrigeres for en eventuel temperaturafvigelse fra 20 °C. Analysen blev igangsat ved omrøring af jordsuspensionen for at opslemme jordpartiklerne, hvorefter den relative densitet af suspensionen blev målt med et hydrometer efter 40 sekunder (til beregning af det procentvise indhold af sandpartikler) og 2 timer (til beregning af det procentvise indhold af lerpartikler). Det procentvise indhold af siltpartikler i suspensionen blev beregnet som differencen mellem jordprøvens vægt og indholdet af sand- og lerpartikler. En separat jordprøve blev udtaget fra hver behandling for at bestemme tørvægts/vådvægts forholdet til beregning af den afvejede jordmængde i tørvægt. Partikelfordelingen blev brugt til at kategorisere de forskellige behandlinger i forhold til jordtype.

6.2.6 MÅLING AF UDVALGTE METALLER

Indholdet af kobber, zink, krom, nikkel, cadmium, bly og sølv i jord fra de forskellige behandlinger blev målt med ICP-MS. Forud for analyserne blev alt glas udstyr syrevasket (1 dag i syrebad) og derefter skyllet tre gange med Milli-Q vand og tørret. Jordprøverne, som blev anvendt til målingerne, blev først tørret ved 105 °C i 24 timer, derefter sigtet på en 1 mm sigte og homogeniseret i en morter og til sidst eftertørret ved 105 °C igen. Efter afkøling blev 200-300 mg tørvægt jord afvejet i en analysebeholder, som blev tilført 1 ml 65% salpetersyre (HNO_3) og 1 ml milli-Q vand. Efter blandingen havde reageret i 1 time, åbnedes prøverne (metallerne ekstraheredes fra jorden) ved hjælp af mikrobølger i et *Milestone start D microwave digestion system*. Prøven blev herefter filtreret gennem et whatman filter over i en 25 ml volumetrisk flaske og der blev fyldt op med milli-Q vand til 25 ml mærket. Der blev tilført 50 µl intern standard (Periodic table mix 1; Sigma Aldrich) til hver prøve og prøveflasken blev omhyggeligt rystet, inden 1 ml blev overført til et testrør og koncentrationen af de udvalgte metaller blev målt på en Agilent 7900 ICP-MS og beregnet ud fra en standardkurve.

6.3 FREMSTILLING OG KARAKTERISERING AF MIKROPLAST

Som positive kontroller for effekter af mikroplast i gødet jord, blev to behandlinger med mikroplast spiket jord inkluderet i forsøgene (se forsøgsbeskrivelser i 5.4 og 5.5). NPK gødet jord blev spiket med enten plastflager eller plastfragmenter til en koncentration på 0,1% på vægtbasis (0,2 g per 200 g tørvægt jord). Oveni dette kommer naturligvis det mikroplastindhold, der allerede måtte være i den NPK gødede jord. Her beskrives fremstilling og karakterisering af de to typer mikroplast, som blev benyttet til spiking af NPK gødet jord.

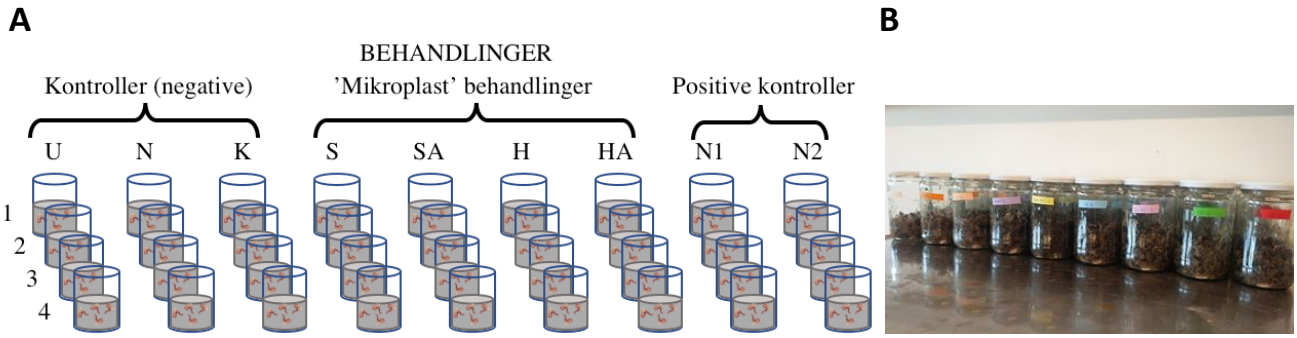
Mikroplast flager blev fremstillet ved at klippe/skære transparent polyethylen (PE) plastpose og transparent/grøn PE plastpose i små stykker af irregulær form og størrelse, blande de to typer og sigte flagerne gennem en 0,5 mm sigte. Framenter blev fremstillet ved at file plastikstøv af en rød polymethylmethacrylat (PMMA/akryl) blok, og fragmenterne blev efterfølgende sigtet på en 0,5 mm sigte.

Størrelse på både flager og fragmenter blev bestemt ved at tage billeder under stereomikroskop af 305 partikler af hver type, og måle længden på den længste led af hver enkelt partikel. Polymertypen for de to mikroplastmaterialer blev desuden verificeret vha. FT-IR analyse.

6.4 LANGTIDSFORSØG (12 UGER)

6.4.1 FORSØGSDESIGN, FORSØGSSTART OG -UDFØRELSE

I langtidsforsøget blev regnorme af arten *A. caliginosa* (Grå orm) eksponeret til 7 forskellige jordtyper fra CRUCIAL forsøgsmarken (ugødet, NPK, kvægmøg, spildevandsslam, spildevandsslam accelereret, komposteret husholdningsaffald og komposteret husholdningsaffald accelereret) samt to positive kontroller i form af mikroplast spiket NPK-gødet jord (figur 2; se 5.3 for beskrivelse af mikroplast til spikning). For hver behandling var der 4 replikate glas á 720 ml, og hvert glas indeholdt 200 g tørvægt jord, 2 gram tørvægt hestemøg fra umedicinerede heste (sigtet til ≤ 2 mm), 4 regnorme og for de positive kontroller 0,2 g mikroplast flager eller fragmenter. Vandindholdet i jorden blev justeret til 60% af WHC for den enkelte jordtype (tabel 1).



Figur 2. Forsøgsdesign for langtidsforsøget (A) og forsøgsopsætning (B). Hver behandling fik en farvekode (B) som blev benyttet hele vejen gennem forsøget. Forkortelser: U, Ugødet; N, NPK gødet; K, Kvægmøg; S, Spildevandsslam; SA, Spildevandsslam accelereret; H, Komposteret husholdningsaffald; HA, Komposteret husholdningsaffald accelereret; N1, NPK gødet jord spiket med PE flager; N2, NPK gødet jord spiket med PMMA fragmenter.

Dagen før eksperimentet blev startet, blev 144+ regnorme taget ud af laboratoriekulturen og inddelt tilfældigt i grupper på 4 orme. Ormene blev skyllet i demineraliseret vand og overført til en petriskål med fugtigt filterpapir over natten (ca. 18 timer) for at tømme tarmene. Jord, hestemøg, vand og eventuelt mikroplastpartikler (for de positive kontroller) til hver behandling blev blandet og efterfølgende fordelt på 4 glas, som blev lukket med et låg for at forhindre væsketab ved fordampning. Den efterfølgende dag (dag 0) blev alle orm forsigtigt duppet tør med et papirhåndklæde og vejet i

gram med 4 decimaler på en analyse vægt (Mettler, AE 163). Bagefter blev alle orm fotograferet til bestemmelse af kropsvolumen. Eksperimentet blev startet ved at ormene blev overført til deres respektive glas, nedgravningsadfærd blev registreret (se 5.4.4) og glassene blev vejet individuelt.

Glassene blev opbevaret i mørke ved 20 ± 2 °C under hele forsøget (12 uger). Vandindholdet i de enkelte glas blev reguleret (holdt stabilt) ved at veje glassene og tilføre demineraliseret vand i hht. vægttabet for de enkelte glas en gang om ugen. Ved hver tilførsel af vand, blev det så vidt muligt noteret hvor i glassene ormene befandt sig. Ved hver censustid (efter 3, 6, 9 og 12 uger) blev ormene sigtet ud af glassene og midlertidigt anbragt på fugtigt filterpapir i en mærket petriskål med låg. Herefter blev de forskellige endpoints noteret (se 5.4.2-5.4.3) og ormene blev overført til nye glas med frisk jord og foder (hestemøg), i hht. de respektive behandlinger, hvorefter nedgravningsadfærd blev registreret (se 5.4.4).

6.4.2 OVERLEVELSE OG VÆKST

Ved hver censustid blev overlevelsen noteret ved optælling af antallet af levende orm i hvert glas.

Ved starten (dag 0) og afslutningen (efter 12 uger) på forsøget blev ormene vejet på en analysevægt efter tømning af tarmene i 18-24 timer. Ved starten af forsøget (dag 0) og hver censustid (efter 3, 6, 9 og 12 ugers eksponering) blev hver orm endvidere fotograferet til bestemmelse af deres kropsvolumen. Tilsvarende blev der taget et billede af en lineal til calibrering af måleenheden. Billederne af orme og lineal blev importeret til billedbehandlingsprogrammet Image J (LOCI, University of Wisconsin-Madison), og længde, L og areal, A af ormene blev målt.

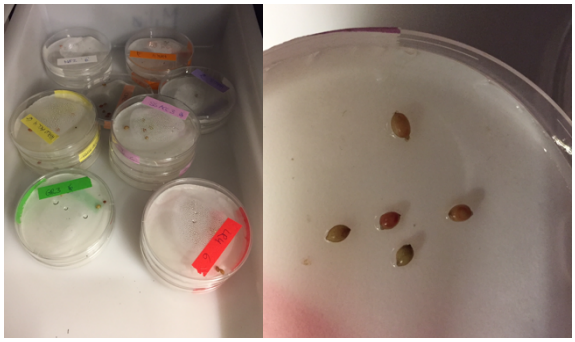
Ved at antage at en orm tilnærmelsesvist har form som en cylinder, blev kropsvolumen estimeret ved formlen: Kropsvolumen = $\frac{\pi A^2}{4L}$

Den størrelsesspecifikke vækstrate fra dag 0 til dag 12 blev på basis af både kropsvolumen og vægt estimeret ved formlen: Størrelsesspecifik vækstrate = $\frac{S_{12}-S_0}{S_0 * 12\ uger}$ * 100%,

hvor S_0 er størrelsen på volumen eller vægt basis til tid 0 og S_{12} er størrelsen til tid 12 uger. Simpel lineær vækst blev benyttet til beregningen, fordi der ikke var noget gennemgående vækstmønster på tværs af behandlingerne.

6.4.3 REPRODUKTION

Ormenes reproduktionsevne angives som antallet af producerede kokoner per orm over de 12 uger forsøget varede samt kokonernes klækningssucces. Når ormene ved hver censustid var fjernet fra deres gamle jord, blev jorden vådsigtet gennem en 1 mm sigte for at indsamle de kokoner, der var produceret i løbet af de tre ugers eksponering. Antallet af kokoner fra hvert glas blev talt, og overført til en mærket petriskål med vådt filterpapir (figur 3). Petriskålene med kokoner blev opbevaret i mørke ved 20 ± 2 °C under klækningen. Når det var nødvendigt, tilførtes ekstra demineraliseret vand til petriskålen for at undgå udtørring. Kokonerne blev tjekket tre gange om ugen (mandag, onsdag og fredag), og ændringer i kokonernes farve blev noteret. Kort før klækning ændres kokonens farve fra grønlig til mørk rød, og



Figur 3. Billedet til venstre viser petriskåle med kokoner produceret i løbet af en tre ugers eksponeringsperiode. Hver behandling havde en farvekode, og hver petriskål indeholder kokonerne fra et af fire replikate glas. Billedet til højre viser et eksempel på kokoner produceret af ormene i et glas i løbet af en tre ugers eksponeringsperiode. Kokonerne starter med at være grønlige, men kort før klækning bliver de mørkerøde som det ses for kokonen i midten.

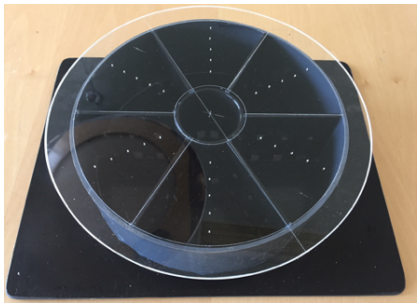
man kunne ofte se bevægelse inde i kokonen. Farveændringen var derfor en indikation på, at klækningen ville ske indenfor få dage. Når en kokon klækkede, blev den juvenile orm samt den tomme kokonskal fjernet fra petriskålen, og det blev noteret at kokonen var klækket. Nogle kokoner klækkede aldrig (de blev alle tjekket minimum to uger ud over forventet tidspunkt for klækning), og enkelte kokoner blev angrebet af svamp inden forventet tidspunkt for klækning. Sidstnævnte blev fjernet fra petriskålen for at undgå at smitte andre kokoner i petriskålen. Da der typisk ikke forekom sådan smitte mellem kokoner, antages det at de kokoner, som blev angrebet af svamp, ikke indeholdt et levedygtigt ormefoster.

6.4.4 NEDGRAVNINGSADFÆRD

Nedgravningsadfærd blev testet både ved forsøgets start og ved hver censustid (efter 0, 3, 6, 9 og 12 ugers eksponering). Nedgravningsadfærden blev testet ved at ormene (4 per glas) blev placeret på jordoverfladen, og med et-minuts intervaller blev det noteret hvor mange af ormene, der havde gravet sig ned indtil alle 4 orm var nedgravet. En orm blev regnet for nedgravet, når hele dens krop var nede i jorden.

6.5 UNDVIGEFORSØG

Undvigeforsøgene blev udført i en særlig test-enhed (figur 4), som giver ormene mulighed for at vælge mellem to eller tre forskellige jordtyper (behandlinger). Test-enheden er en cylinder med en mindre cylinder i midten. Området mellem de to cylindere er inddelt i 6 'lagkagestykker' og der er huller, store nok til at en orm med lethed kan bevæge sig gennem hullet, mellem lagkagestykkerne samt fra den inderste cylinder og ud til lagkagestykkerne. Lagkagestykkerne blev fyldt til lige under kanten med jord af den ønskede type, således at behandlingerne ligger skiftevis rundt i cirklen. På den måde havde den enkelte orm altid adgang til en alternativ behandling i hullet ved siden af det, den befandt sig i. I bunden af den midterste cylinder blev placeret et fugtigt filterpapir. Vandindholdet i jorden blev ligesom i langtidsforsøget justeret til 60% af WHC for den enkelte jordtype (tabel 1)



Figur 4. Test enhed til undvigeforsøg. I hvert 'lagkagestykke' fyldes jord af skiftevist 2 (eller 3) forskellige typer, og testorganismerne tilsættes i midten af enheden ved starten af forsøget.

Forsøget blev startet ved at 10 orm blev tilsat i den midterste cylinder og låget blev lagt på. Ormene fik herefter 48 timer i mørke og ved 20 ± 2 °C til at bevæge sig rundt i test-enheden og beslutte sig for hvilken behandling, de helst ville være

	Forsøgsnummer								
Behandling	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Kvægmøg									
Slam									
Slam Acc									
HHA									
HHA Acc									
NPK									
NPK flage									
NPK fragment									

: Både Grå orm og Kompost orm
: Kun Kompost orm

Figur 5. Oversigt over de benyttede jordtyper i de 9 undvigeforsøg, F1-F9 der blev udført enten med både *A. caliginosa* og *E. veneta* (orange) eller kun med *E. veneta* (blå). Acc, accelereret; HHA, Komposteret husholdningsaffald; NPK flage, NPK gødet jord som er tilsat ekstra mikroplast i form af polytehylen flager; NPK fragment, NPK gødet jord som er tilsat ekstra mikroplast i form af acrylfragmenter.

i. Efter de 48 timer blev der sat skillevægge uden huller ned mellem lagkagestykkerne, så ormene ikke længere kunne flytte rundt. Jorden i hvert lagkagestykke blev gennemsøgt og det blev registreret hvor mange orm, der befandt sig i hvert stykke.

Der blev udført 9 undvigeforsøg (figur 5) F1-F9, hvoraf F1-F4 blev udført både med den grå orm (*A. caliginosa*) og kompostormen (*E. veneta*), mens de sidste 5 (F5-F9) kun blev udført med *E. veneta*. Alle forsøg blev udført i triplikat. I et af forsøgene (F7) sammenlignedes tre forskellige behandlinger, og i dette ene tilfælde benyttedes 12 orm per test-enhed. I de øvrige forsøg sammenlignedes to behandlinger per forsøg.

6.6 STATISTIK

Statistisk sammenligning af jordkarakteristika og metalindhold i de forskellige behandlinger blev udført med en-vejs variansanalyse (ANOVA) efter forudgående analyse af om data var normaltfordelte (Kolmogorov-Smirnov test) og om der var afvigelser fra varians homogenitet mellem de sammenlignede behandlinger (Levenes test).

Til sammenligning af vækst, reproduktion og nedgravningsadfærd hos orm, eksponeret til forskellige jordtyper, benyttedes henholdsvis en-vejs ANOVA (vækstrate og reproduktions parametre) og to-vejs ANOVA (kropsvolumen over tid og nedgravningsadfærd).

Der blev anvendt en Pearson X^2-test (chi-i-anden) til at teste om ormenes valg mellem to (i et tilfælde tre) forskellige behandlinger i undvigeforsøgene var statistisk signifikante.

ANOVA, Levenes og Kolmogorov-Smirnov tests blev udført v.h.a. statistikprogrammet Systat version 13.2 mens X^2 testen blev udført i Excel. Der blev benyttet et signifikansniveau på 5% i alle tests.

7 RESULTATER OG DISKUSSION

7.1 KARAKTERISERING AF JORD OG TILSAT MIKROPLASTIK

Jorden anvendt i forsøgene var lerjord fra CRUCIAL marken, og alle behandlinger var, ikke uventet, af den samme jordtype (jorden fra parceller gødet med komposteret husholdningsaffald lå lige på grænsen mellem to jordtyper). Formålet med karakterisering af jorden fra de forskellige behandlinger var at undersøge, om der var forskelle, udover forskel i mikroplast indholdet, som kunne forklare eventuelle observerede forskelle i regnormenes vækst, overlevelse, reproduktion eller adfærd. Karakteriseringen skulle desuden sikre at jorden var et egnet medium for ormene, samt sikre at jorden blev fugtet til et niveau, som er optimalt for ormenes fitness.

Den maksimale vandbærekapacitet (WHC) blev brugt til at beregne hvor meget vand, hver af jordtyperne skulle tilsættes for at opnå en fugtighedsgrad på 60% af WHC som anbefalet for *Aporrectodea caliginosa* i laboratoriekultur (f.eks. Bart et al 2018). En fugtighedsgrad på 60% af WHC resulterede i et vandindhold i behandlingsjordene på 29-37% afhængig af behandling. WHC var signifikant højere i jord gødet med accelereret niveau af komposteret husholdningsaffald sammenlignet med ugødet, NPK gødet og jord gødet med spildevandsslam (tabel 1), men ellers var der ikke statistisk signifkante forskelle mellem nogen behandlinger (bilag 2, tabel B2.1).

Der var signifikant forskel på pH mellem flere af behandlingerne (bilag 2, tabel B2.1), men alle jordtyper havde pH værdier tæt på eller indenfor det pH interval på 6-7 (tabel 1), som er anbefalet for *A. caliginosa* (Bart et al 2018). Forskellene i pH mellem de forskellige behandlinger antages derfor ikke at bidrage til at drive observerede forskelle i de målte effektparametre.

Tabel 1. Målte jordparametre og indhold af udvalgte metaller i de 7 behandlinger: spildevandsslam, spildevandsslam i accelereret niveau, komposteret husholdningsaffald (HHA), komposteret husholdningsaffald i accelereret niveau, kvægmøg, NPK gødning og ugødet jord. Forkortelser: TOM, total organisk materiale; TC, total carbon; TN, total nitrogen; C:N ratio, forholdet mellem carbon og nitrogen; WHC, vandbære evne. Værdier er opgivet som gennemsnit og (standard afvigelse) af tre replikater undtagen for partikel størrelsesfordeling, hvor der kun blev lavet enkelt bestemmelse.

Jordparameter/ metal indhold	**Slam**	**Slam Acc**	**HHA**	**HHA Acc**	**Kvæg-møg**	**NPK**	**Ugødet**
pH	6,32 (0,02)	6,00 (0,04)	6,46 (0,16)	6,68 (0,18)	6,08 (0,02)	5,96 (0,03)	6,12 (0,05)
TOM (% af tørvægt)	4,31 (0,03)	4,81 (0,02)	5,55 (0,05)	8,47 (0,09)	4,85 (0,06)	3,87 (0,07)	3,70 (0,03)
TC (% af tørvægt)	2,05 (0,82)	1,80 (0,19)	2,17 (0,24)	3,45 (0,72)	1,88 (0,22)	1,32 (0,01)	1,25 (0,10)
TN (% af tørvægt)	0,20 (0,04)	0,18 (0,02)	0,18 (0,01)	0,30 (0,07)	0,16 (0,02)	0,14 (0,01)	0,14 (0,02)
C:N ratio	10,16 (1,96)	10,24 (1,16)	11,91 (1,17)	11,57 (0,69)	11,79 (1,77)	9,56 (0,38)	8,91 (0,27)
WHC (% af tørvægt)	49,26 (4,48)	59,65 (1,33)	55,56 (2,33)	67,30 (11,14)	53,09 (2,23)	50,94 (2,91)	49,17 (6,22)
% sand partikler*	64	60	65	63	59	67	67
% silt partikler*	19	22	20	20	22	16	16
% ler partikler*	17	18	15	17	19	16	16
Jordtype**	JB-5	JB-5	JB-4/JB-5	JB-5	JB-5	JB-5	JB-5
Partikler >2mm (%)	2,3	3,3	3,1	5,0	5,7	3,5	3,9
Kobber (µg/g)	17,12 (0,50)	20,76 (0,63)	15,88 (0,62)	27,02 (0,81)	21,85 (0,77)	17,43 (0,56)	16,95 (0,14)
Zink (µg/g)	38,04 (0,90)	58,03 (2,08)	56,20 (5,09)	69,03 (3,82)	43,38 (7,77)	40,42 (9,12)	46,06 (9,28)
Krom (µg/g)	15,59 (0,69)	15,99 (0,59)	15,35 (0,31)	15,74 (0,17)	15,93 (0,93)	15,23 (0,63)	17,93 (0,31)
Nikkel (µg/g)	7,65 (0,21)	8,27 (0,40)	7,28 (0,24)	8,36 (0,18)	7,68 (0,18)	7,75 (0,18)	8,67 (0,09)
Cadmium (ng/g)	169,2 (8,0)	197,4 (9,3)	185,8 (8,3)	200,9 (8,0)	163,3 (9,9)	175,4 (28,9)	155,8 (3,7)
Bly (µg/g)	13,03 (0,25)	13,64 (0,72)	13,67 (0,77)	14,18 (0,62)	12,15 (0,20)	12,01 (0,17)	12,89 (0,18)
Sølv (ng/g)	183,9 (7,6)	419,2 (47,0)	63,8 (10,2)	87,2 (8,0)	33,8 (0,6)	30,4 (1,1)	35,3 (1,4)

*) Procent af partikler sigtet til <2mm. Lerpartikler <0,02 mm, siltpartikler = 0,002-0,05 mm, sandpartikler = 0,05-2 mm. **) Jordtyper i hht. klassificering anvendt inden for dansk landbrug. JB-4 står for fin sandblandet lerjord og JB-5 står for lerjord.

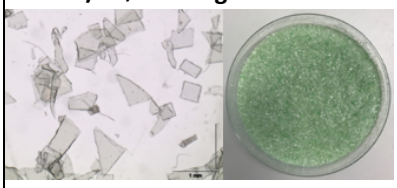
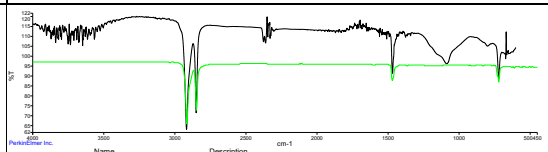
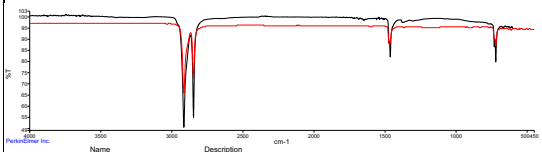
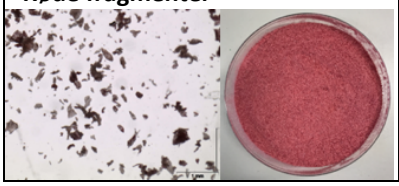
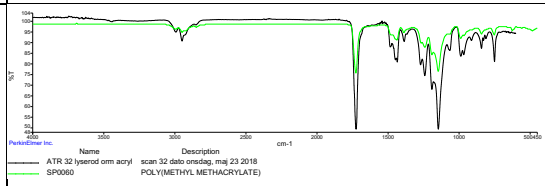
Da alle behandlinger under langtidsforsøget blev tilført den samme mængde føde per orm i form af hestemøg (2 g tørvægt til 4 orm i 3 uger) og jorden ikke blev tilført hestemøg under undvigeforsøgene, er eventuelle forskelle i

indholdet af organisk materiale afgørende for hvilken fødemængde og fødekvalitet, ormene har adgang til under forsøgene. Indholdet af organisk materiale i de forskellige behandlingsjorde blev målt både som det totale indhold af organisk materiale (TOM) og som indholdet af henholdsvist total carbon og total nitrogen. De målte TOM procenter var, med en enkelt undtagelse (kvægmøg sammenlignet med spildevandsslam), statistisk signifikant forskellige mellem alle behandlinger (bilag 2, tabel B2.1). Særligt skal det bemærkes, at det totale organiske indhold i både ugødet og NPH gødet jorde var signifikant lavere end i alle øvrige behandlinger, mens det højeste indhold af organisk materiale var i komposteret husholdningsaffald (begge niveauer) (tabel 1). Jord gødet med accelereret niveau af komposteret organiske husholdningsaffald havde desuden et signifikant højere indhold af total carbon og total nitrogen sammenlignet med alle de øvrige behandlinger, som ikke var signifikant forskellige i forhold til indhold af carbon og nitrogen (tabel 1 og bilag 2, tabel b2.1). C:N ratioen varierede lidt mellem behandlingerne, og der var en tendens til at ratioen var lavere i NPK gødet og ugødet jord sammenlignet med de øvrige behandlinger, men disse variationer var ikke statistisk signifikante.

Indholdet af de målte metaller viste relativt små variationer mellem behandlinger (tabel 1), nogle af disse var statistisk signifikante (Bilag 2, tabel B2.2), men der var kun få overordnede mønstre i disse forskelle. Det tydeligste eksempel var for sølv, hvor der var signifikant mere sølv i jord gødet med spildevandsslam og til dels også i jord tilsat komposteret husholdningsaffald i accelererede mængder sammenlignet med de øvrige behandlinger. Der var dog ikke nogen behandlinger som konsistent havde højere eller lavere indhold af metaller end andre.

Karakteriseringen af de to tilsatte mikroplast typer, flager og fragmenter, viste at flagerne gennemsnitligt var lidt større end fragmenterne (tabel 2). FT-IR analyserne af materialerne bekræftede at flagerne var af polymertypen polyethylen (PE), mens fragmenterne var polymethylmethacrylate (PMMA).

Tabel 2. Karakterisering af tilsat mikroplast. Hvide/grønne flager blev skåret af to forskellige typer af fryseposer og røde fragmenter blev filet af akryl blok. For størrelsesbestemmelse blev 305 partikler af hver type målt på den længste led under stereomikroskop.

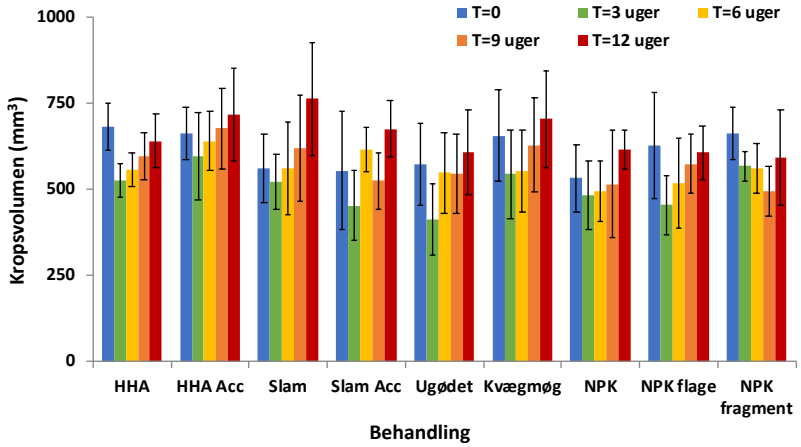
Partikeltype	Længde på længste led (Gns i mm ± SD)	Min. – max. størrelse (mm)	FT-IR spektrum
Hvide/Grønne flager 	0,42 ± 0,16	0,05 – 1,34	 
Røde fragmenter 	0,26 ± 0,22	0,02 – 1,33	

7.2 LANGTIDSFORSØG

7.2.1 OVERLEVELSE OG VÆKST

Der var ingen effekter af behandling på ormenes vækst. I alt døde 8 orm ud af 144 under de 12 ugers eksponering, heraf døde 2 orm, fordi de flygtede fra petriskålen og tørrede ud i forbindelse med opmåling og overførsel til et nyt glas. Det svarer til en samlet dødelighed på 5,6%, og der var ikke nogen tydelig overrepræsentation af dødelighed i særlige behandlingstyper.

I løbet af de første tre uger af eksponeringen var der en tendens til et fald i ormenes kropsvolumen (figur 6), men i løbet af de efterfølgende uger af eksponeringen indhentede ormene i de fleste behandlinger igen det tabte (figur 6, tabel 3). Der var ingen signifikant forskel mellem behandlingerne på ormenes vækst over alle 12 uger, hverken målt på vægt eller volumenbasis (tabel 3).



Figur 6. Udvikling i ormestørrelse (volumen i mm^3) over de 12 ugers eksponering. Størrelsen er opgivet som gennemsnit af 4 replikater ± standardafvigelse.

I modsætning til Lwanga et al (2016) fandt vi i dette studium ingen effekter på overlevelse eller vækst ved langtidseksponering af regnorm til tilsat mikroplast (NPK vs NPK flage og NPK vs. NPK fragment). I studiet af Lwanga et al (2016) undersøgte forfatterne effekter på regnorme arten *Lumbricus terrestris* af polyethylen fragmenter <150 µm tilsat til organisk materiale (førne) på jordoverfladen. *L. terrestris* graver vertikale gange i jorden, og lever af det organiske materiale, den kan finde i førnen på jordoverfladen. Den har således en helt anden fødesøgningsstrategi end *A. caliginosa*, som graver horisontalt i de øverste 20 cm af jordoverfladen og lever af det organiske materiale i jorden som den indtager. Forfatterne eksponerede ormene til mikroplastik i førne i koncentrationer på 0, 7, 28, 45 og 60% mikroplast på vægtbasis, hvilket ifølge forfatterne svarede til gennemsnitlige koncentrationer i hele jordsøjlen på hhv. 0,2%, 0,4%, 0,5% og 1,2 % på vægtbasis. Ved 60 dages eksponering til disse koncentrationer fandt forfatterne højere dødelighed og lavere vækst hos orm eksponeret til 28, 45 og 60% mikroplast i førnen sammenlignet med kontrollen (ingen tilsat mikroplast) og 7% mikroplast tilsat førnen. I et tidligere studium på Roskilde Universitet (Karling 2018) blev regnorm af en tredje art, *Eisenia veneta*, eksponeret i 12 uger til flere af jordtyperne fra CRUCIAL marken samt til en behandling, hvor Polyethylenterephtalat (PET) fibre blev tilsat til NPK gødet jord i en koncentration på 0,1 vægtprocent. Ligesom for *A. caliginosa*, var der i dette studium heller ingen forskel på ormevæksten over 12 uger i de forskellige testede behandlinger, inklusiv behandlingen med tilsat mikroplast i form at PET fibre. Tilsvarende fandt Rodriguez-Seijo et al. (2017) i et nyligt studium ingen effekter på overlevelse og vækst hos en tæt relateret regnormeart, *Eisenia andrei*, ved eksponering af ormene til polyethylen fragmenter (250-1000 µm) i jord i koncentrationer op til 0,1% på vægtbasis.

Eksponeringskoncentrationerne i Lwanga et al (2016) var således generelt højere end den koncentration, der blev anvendt som positiv kontrol i både dette forsøg med *A. caliginosa* (0,1% på vægtbasis for både PE flager og PMMA fragmenter) og de tidligere forsøg med *E. veneta* (Karling, 2018) og *E. andrei* (Rodriguez-Seijo et al., 2017). De koncentrationer, hvor Lwanga et al (2016) fandt effekter på overlevelse og vækst, var mindst en faktor 4 højere end koncentrationerne anvendt som positiv kontrol i dette studium, hvis der tages udgangspunkt i den gennemsnitlige koncentration i jordsøjlen, og mindst en faktor 280 højere hvis der tages udgangspunkt i den reelle mikroplast

koncentration i ormenes føde. Forskellene i observerede effekter på vækst og overlevelse i de to studier skyldes derfor sandsynligvis en kombination af forskellige eksponeringskoncentrationer og anvendelse af forskellige regnormearter med forskellige fødesøgningsstrategier.

Det er oplagt at sætte spørgsmålstegn ved om koncentrationen af tilsat mikroplast i dette forsøg var høj nok til at fungere som en 'worst case' eksponering og derfor som positiv kontrol. Den nye bekendtgørelse om anvendelse af affald til jordbrugsformål (BEK 1001, 2018) har en grænseværdi for fysiske urenheder >2 mm i kompost og forbehandlet biopulp på 0,5 vægtprocent af tørstofindholdet. Der er ingen grænseværdier eller analyse krav for indholdet af mikroplast <2 mm i kompost eller biopulp. De spikede behandlinger i dette studium blev medtaget som positive kontroller, fordi et indhold af plastik på 0,1 vægtprocent blev anset for at være relativt højt i landbrugsjord, selv om det dog ikke kan afvises, at mikroplast kan akkumulere til dette niveau ved gentagene anvendelse af organiske affaldsressourcer som gødning på et givent område gennem en årrække. Særligt hvis plastikken ikke nedbrydes eller på anden måde fjernes fra marken. Der er kun ganske få eksempler fra den publicerede litteratur, hvor indholdet af mikroplast partikler i størrelser <2 mm er målt eller estimeret på vægtbasis i enten organiske ressourcer eller landbrugsjord. I en rapport udarbejdet til Miljøstyrelsen i 2017 (Vollertsen & Hansen, 2017) samt en rapport udgivet af Svenskt Vatten AB (Ljung et al., 2018) blev jord fra forskellige landbrugsarealer og feltforsøg analyseret for mikroplast i hhv. størrelsesordenen 20-500 µm (Vollertsen & Hansen, 2017) og 10-5000 µm (Ljung et al., 2018), og forfatterne fandt mikroplastindhold på 0,004-0,05 ‰ per tørvægt. Begge disse studier fandt således mikroplastkoncentrationer, som var væsentligt lavere end de 0,1 vægtprocent som er anvendt som positiv kontrol i dette forsøg, og dette understøtter at de spikede mikroplast behandlinger anvendt i dette forsøg med rimelighed kan anses for at være positive kontroller.

Tabel 3. Størrelsesspecifik vækstrate over hele eksponeringsperioden på 12 uger. Raterne er opgivet som gennemsnit ± standard afvigelse, og er målt både på volumen og vægtbasis.

Behandling*	Vækstrate over eksponeringsperioden per volumen ($\% * mm^{-3} * uge^{-1}$)	Vækstrate over eksponeringsperioden per vægt ($\% * g^{-1} * uge^{-1}$)
HHA	-0,3 ± 1,5	0,2 ± 1,2
HHA Acc	0,8 ± 1,8	-0,4 ± 0,8
Slam	3,1 ± 0,9	0,9 ± 1,0
Slam Acc	2,0 ± 1,2	0,4 ± 1,3
Ugødet	0,6 ± 1,2	-0,2 ± 0,4
Kvægmøg	0,8 ± 2,4	-0,1 ± 0,3
NPK	1,2 ± 1,0	-0,1 ± 0,4
NPK flage	0,2 ± 2,9	-1,0 ± 1,8
NPK fragment	-0,9 ± 1,7	-0,9 ± 1,7

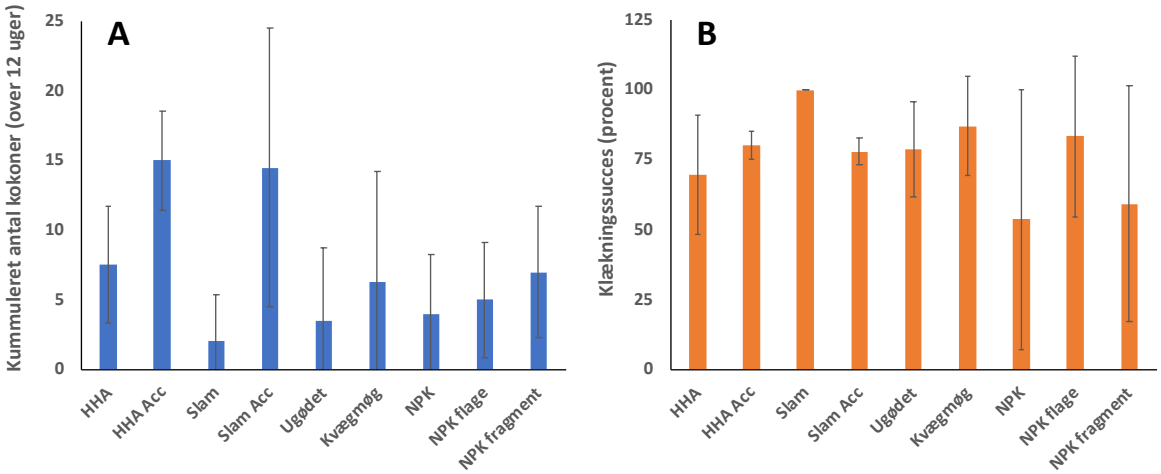
*) Forkortelserne står for: HHA, komposteret husholdsaffald; Acc, accelereret niveau.

7.2.2 REPRODUKTION

Der var stor variation i kokonproduktionen i de forskellige replikate glas (figur 7a), hvor ormene i nogle glas producerede helt op til 22 kokoner over de 12 ugers eksponering, mens ormene i andre glas slet ikke producerede nogle kokoner. Der var en tendens til en forøget kokonproduktion hos orme eksponeret til jord gødet med accelererede niveauer af spildevandsslam og komposteret organisk husholdningsaffald sammenlignet med de øvrige behandlinger, men disse tendenser var ikke statistisk signifikante pga. den store variabilitet mellem glassene.

Klækningseffektiviteten af de producerede kokoner lå fra 54 til 100 % i de forskellige behandlinger (figur 7b), men der var ingen signifikant effekt af behandling på kokonernes klækningseffektivitet.

Ligesom i studiet af Lwanga et al (2016), hvor orme blev eksponeret til væsentligt højere mikroplast koncentrationer, var der heller ikke i dette studium effekt af tilsat mikroplastik (NPK vs NPK flage og NPK vs. NPK fragment) på ormenes reproduktion. Dette resultat understøttes yderligere af at reproduktionen hos *E. veneta* og *E. andrei* i de tidligere omtalte studie (Karling, 2018; Rodriguez-Seijo et al., 2017) heller ikke blev påvirket af tilsat mikroplast i form af hhv. PET fibre og PE fragmenter i koncentrationer på op til 0,1 % på vægtbasis.

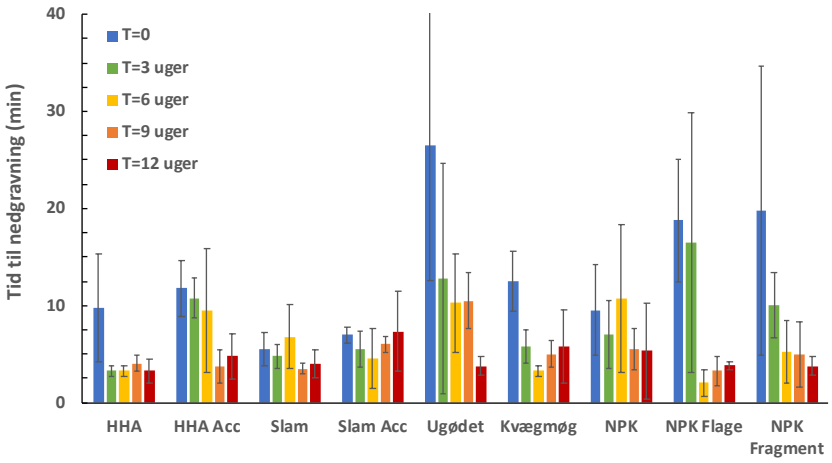


Figur 7. Reproduktion i form af kummuleret antal kokoner produceret per replikat over 12 ugers eksponering (A) samt klækningssucces for de producerede kokoner (B). Error bars er standardafvigelser.

Ved histopatologiske undersøgelser af de eksponerede orms tarme fandt Rodriguez-Seijo et al. (2017) dog, i deres studie af *E. andrei*, indikation på tarmskader og effekter på ormenes immunsystem, i form af forstoppelse, fibrose og tarminflammation, ved mikroplast koncentrationer over ca. 0,01% på vægtbasis. Dette indikerer at tilstedeværelsen af mikroplast kan være en stressfaktor for regnorm selv om dette ikke nødvendigvis resulterer i målbare effekter på individ niveau.

7.2.3 NEDGRAVNINGSADFÆRD

Forøgelse af nedgravningstiden hos regnorme kan være et udtryk for enten undvige adfærd eller at ormene er fysiologisk påvirket så de reagerer langsommere eller har sværere ved at grave sig ned. Det er økologisk relevant at undersøge nedgravningsadfærd, fordi regnorme, som graver sig langsommere ned, er i forøget risiko for udtørring og prædation fra rovdyr. Forskelle i nedgravningstid til tid 0 vil typisk være et udtryk for undvigeadfærd, da ormene endnu ikke kan være fysiologisk påvirket af behandlingerne, mens forskelle i nedgravningstid på et senere tidspunkt i forsøget kan være udtryk for enten undvige adfærd, fysiologisk påvirkning eller en kombination af de to.



Figur 8. Nedgravningsadfærd. Figuren viser den gennemsnitlige tid i minutter det tog for alle 4 orm i et glas at grave sig helt ned. Error bars er standardafvigelser.

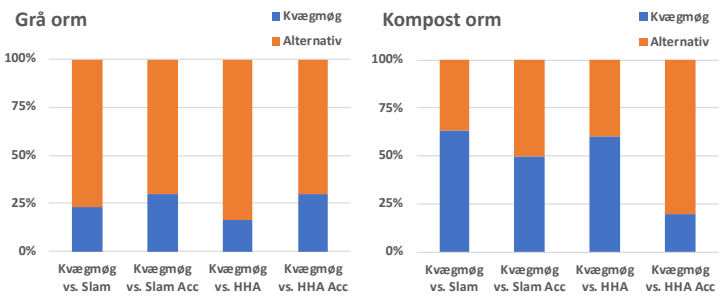
Der var ikke noget tydeligt mønster i nedgravningsadfærd (figur 8), men der var en tendens til at ormene graver sig lidt langsommere ned i ugødet jord sammenlignet med de øvrige behandlinger. Denne tendens var dog ikke statistisk signifikant. For orme i nogle behandlinger var der en tendens til, at nedgravningstiden faldt fra første gang ormene blev præsenteret for behandlingen til de efterfølgende gange i løbet af eksponeringstiden, hvilket kunne indikere at ormene havde behov for at vænne sig til de pågældende behandlinger. Dette var dog ikke

konsistent på tværs af alle behandlinger (statistisk signifikant interaktion mellem behandling og eksponeringstid i 2-vejs ANOVA), og i andre behandlinger var nedgravningstiden den samme uafhængigt af eksponeringstid.

Ormenes nedgravningstid var ikke signifikant forskellige i NPK gødet jord og behandlinger med NPK gødet jord tilsat mikroplast i form af enten PE flager eller PMMA fragmenter, hvilket er i overensstemmelse med at nedgravningstiden for *E. veneta* ligeledes ikke blev påvirket af tilstedeværelsen af mikroplast i form af PET fibre (Karling, 2018).

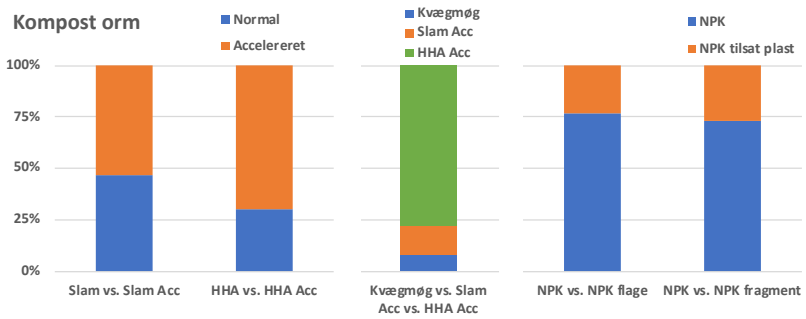
7.3 UNDVIGEADFÆRD

Forsøgene, som skulle undersøge undvige adfærd, er opdelt i grupper af forsøg med hhv. *A. caliginosa* og *E. veneta*. Årsagen til at der blev inkluderet ekstra forsøg med *E. veneta*, var at der ikke var indsamlet tilstrækkeligt med orm af arten *A. caliginosa* til at lave alle de sammenligninger af behandlinger vi fandt relevant. Kompostormen *E. veneta* kan købes hjem som kultur, og yderligere forsøg med denne art var derfor et gennemførligt alternativ indenfor projektets tidshorisont. For at undersøge om de to ormearter træffer ensartede valg, når de bliver stillet overfor de samme valgmuligheder, blev de fire første sammenligninger gentaget for begge arter (figur 9). Herefter blev yderligere 5 undvigeforsøg udført med *E. veneta* alene (figur 10).



Figur 9. Undvigeadfærd hos *Aporrectodea caliginosa* (Grå orm) og *Eisenia veneta* (kompostorm) ved valg mellem kvægmøgsgødet jord og et alternativ i form af jord gødet med spildevandsslam (slam), spildevandsslam i accelereret niveau (Slam Acc), komposteret organisk husholdningsaffald (HHA) eller komposteret organisk husholdningsaffald i accelereret niveau (HHA Acc). Figuren viser hvordan ormene fordelte sig procentvist mellem de tilbudte behandlinger.

Sammenligning af de to arters valg mellem kvægmøg og et alternativ, i form af enten spildevandsslam eller komposteret organisk husholdningsaffald (figur 9), viste at *A. caliginosa* konsekvent foretrækker alternativet frem for kvægmøg uafhængigt af gødningsniveauet, mens *E. veneta* kun foretrækker alternativet, når der er tale om husholdningsaffald i accelereret niveau. Jordtyperne, gødet med behandlingerne kvægmøg, komposteret organisk husholdningsaffald i normalt niveau og spildevandsslam i begge niveauer, har alle relativt ens indhold af organisk materiale (TOM% varierer mellem 4,3 og 5,6 % af tørvægt for kvægmøg, de to slambehandlinger og husholdningsaffald i normalt niveau, se tabel 1), mens det organiske indhold i behandlingen med husholdningsaffald i accelereret niveau er væsentligt højere end de øvrige (8,5%; se tabel 1). Der kan dog være forskelle i tilgængeligheden af det organiske materiale i de forskellige gødningstyper, og det er sandsynligt, at det er sådanne forskelle som er afgørende for, at de to arter udviser forskellig adfærd. Kompostorm (f.eks. *E. veneta*) har således generelt et større behov for let tilgængeligt organisk materiale end *A. caliginosa*, som kan leve på en fattigere diæt (Bart et al., 2018). Fælles for begge regnorme arter er dog, at der ikke er noget der tyder på, at tilstedeværelsen af mikroplast (som forventes at være højere i jord gødet med spildevandsslam og komposteret husholdningsaffald sammenlignet med jord gødet med kvægmøg) driver ormenes valg af habitat, når der er forskel på fødetilgængelighed og fødekvalitet i de to behandlinger, de tilbydes.



Figur 10. Undvigeadfærd hos *Eisenia veneta* (kompostorm). Ormene fik valget mellem 1) normale og accelererede (Acc) niveauer af hhv. spildevandsslam og komposteret organisk husholdningsaffald (HHA), 2) kvægmøg og accelererede niveauer af spildevandsslam og komposteret organisk husholdningsaffald, og 3) NPK gødet jord og NPK gødet jord tilsat mikroplat i form af enten polyethylen flager eller akryl fragmenter. Figuren viser hvordan ormene i hvert forsøg fordelte sig procentvist mellem de tilbudte behandlinger.

Noget tilsvarende gjorde sig gældende i forsøget, hvor *E. veneta* blev tilbudt valget mellem normale og accelererede niveauer af hhv. spildevandsslam og komposteret organisk husholdnings-affald (figur 10). Her valgte ormene for husholdningsaffald det accelererede niveau frem for det normale, men tog ikke et aktivt valg mellem accelereret og normalt niveau, når det drejede sig om spildevandsslam. Dette kan igen forklares med indholdet af organisk materiale i de forskellige behandlinger, idet indholdet er næsten ens i de to niveauer af spildevandsslam (hhv. 4,3% og 4,8%), men forskelligt i de to niveauer af husholdningsaffald (5,6% i det normale og 8,5% i det accelererede niveau). Når ormene blev tilbudt et valg mellem tre forskellige behandlinger, bestående af kvægmøg, slam i accelereret niveau og husholdningsaffald i accelereret niveau (figur 10), valgte de i alt overvejende grad jord gødet med husholdningsaffald i accelereret niveau, som har det højeste indhold af organisk materiale. Disse forsøg indikerer ligeledes at ormene tilvælger høj fødetilgængelighed/-kvalitet frem for at undvige mikroplast i jorden.

I det sidste sæt forsøg blev *E. veneta* tilbudt valget mellem NPK gødet jord og NPK gødet jord tilsat mikroplast i form af enten PE flager eller PMMA fragmenter (figur 10). I dette forsøg, hvor fødemængde og fødetilgængelighed var den samme (bortset fra den minimale fortynding af føden med mikroplast), var ormene tilsyneladende i stand til at detektere mikroplasten, og valgte behandlingen uden mikroplast frem for behandlingerne med tilsat mikroplast.

Samlet set viser undvigeforsøgene at regnorm (af arten *E. veneta*) er i stand til at detektere mikroplast, og vælger at undvige dette, hvis fødekvalitet og -mængde ikke er dårligere i det alternativ, de har adgang til. Hvis ormene (både *E. veneta* og *A. caliginosa*) bliver stillet overfor et valg, hvor der er forskel på enten fødemængde, fødekvalitet eller begge, men hvor fødekvalitet/-mængde er negativt korreleret med mikroplastindhold, så er det fødekvalitet/-mængde frem for mikroplastforekomst, der driver ormenes valg.

8 HOVEDKONKLUSIONER

Formålet med projektet var at undersøge om anvendelsen af organiske affaldsressourcer (spildevandsslam og komposteret husholdningsaffald) som gødning, herunder specifikt mikroplast i gødningen, påvirker adfærd, overlevelse, vækst og reproduktion hos regnorm.

Resultaterne viser, at nogle af de testede gødningsformer giver bedre forhold end andre for den almindeligt forekommende grå orm (*A. caliginosa*), hvilket primært ses på en tendens til forøget reproduktion i jord gødet med de accelererede niveauer af spildevandsslam og husholdningsaffald samt ormenes valg af jord gødet med spildevandsslam og husholdningsaffald frem for kvægmøg. Der var ingen indikation på at tilstedeværelse af mikroplast i jord (op til 0,1 % på vægtbasis) påvirkede *A. caliginosa* på overlevelse, vækst eller reproduktion.

Valget af jordtype, for begge de testede arter i adfærdsforsøgene, var primært drevet af fødetilgængelighed og/eller fødekvalitet (type og mængde af organisk materiale) frem for et behov for at undvige urenheder i form af mikroplast i jorden. Men hvis fødekvaliteten var den samme, kunne *E. veneta* detektere mikroplast og ormene valgte at undvige tilsat plast i en koncentration på 0,1 vægtprocent.

Resultaterne (fraværet af negative effekter på overlevelse, vækst og reproduktion) i dette studium stemmer generelt godt overens med et tidligere specialestudium på Roskilde Universitet (Karling, 2018) samt et studium af Rodriguez-Seijo et al. (2017), som begge testede effekter af mikroplast i koncentrationer på op til 0,1% på vægtbasis, på to forskellige arter af kompostorme. Sidstnævnte (Rodriguez-Seijo et al., 2017) fandt dog cellulære effekter af mikroplast eksponering helt ned til ca. 0,01% mikroplast i jord. Selv om et studium af en fjerde regnormeart, *L. terrestris* (Lwanga et al. 2016) fandt effekter på både overlevelse og vækst (men ikke reproduktion) af mikroplast tilsat ormenes føde, så var eksponeringskoncentrationerne så høje, at de vurderes at ligge over det realistiske niveau i almindelig landbrugsjord. Der er derfor ikke noget i dette eller tidligere studier, der indikerer, at mikroplastindholdet i organiske ressourcer vil få negative konsekvenser for regnormebestanden ved udbringning af disse ressourcer på landbrugsjord i henhold til gældende regler.

Da regnorme naturligvis ikke er de eneste centrale organismer på landbrugsjord og i det terrestriske miljø i det hele taget, er der dog behov for at udføre yderligere tests med andre nøglearter i det terrestriske miljø, inden det endeligt kan konkluderes, om udbringning af organiske ressourcer indeholdende mikroplast kan få miljømæssige konsekvenser. Der er ligeledes behov for mere omfattende undersøgelser af mikroplast forekomsten i det terrestriske miljø, både på landbrugsjord og i andre terrestriske miljøer.

9 REFERENCER

Bart S, Amossé J, Lowe CN, Mougin C, Péry ARR, Pelosi C. *Aporrectodea caliginosa*, a relevant earthworm species for a posteriori pesticide risk assessment: current knowledge and recommendations for culture and experimental design. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 33867-33881. Doi: 10.1007/s11356-018-2579-9.

BEK nr. 1001. 2018. Bekendtgørelse om anvendelse af affald til jordbrugsformål af 27/06/2018. Lovtidende A, https://www.retsinformation.dk/Forms/R0710.aspx?id=202047.

BEK nr. 722. 2019. Bekendtgørelse om miljøregulering af dyrehold og om opbevaring og anvendelse af gødning af 09/07/2019. Lovtidende A, https://www.retsinformation.dk/Forms/R0710.aspx?id=209690#idbd40cbae-94aa-4cfa-9d23-4c204bb76903.

Habib D, Locke DC, Cannone LJ. 1998. Synthetic fibers as indicators of municipal sewage sludge, sludge products, and sewage treatment plant effluents. *Water, air, and soil pollution* 103, 1-8.

Karling ND. 2018. Investigating the effects of different fertilizing treatments on earthworms – View on potential impacts of microplastic. Master Thesis, Roskilde University, Denmark (ikke offentliggjort, dele af resultaterne forventes at blive indsendt til publicering i et internationalt tidsskrift i 2019).

Ljung E, Olesen KB, Andersson P-G, Fältström E, Vollertsen J, Wittgren HB, Hagman M. 2018. Mikroplaster i kretsloppet. Rapport Nr. 2018-13. Svenskt Vatten AB.

Lundbøl Vestergaard S, Hamann Sandgaard M, Kragh Andersen J, Palmqvist A. 2018. Mikroplast forekomst i KOD-biopulp. Projektnr. 118917, Københavns Kommune (forventes offentliggjort primo 2019).

Lwanga EH, Gertsen H, Gooren H, Peters P, Salánka T, van der Ploeg M, Besseling E, Koelmans AA, Geissen V. 2016. Microplastics in the terrestrial ecosystem: Implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbicidae). *Environmental Science and Technology* 50, 2685-2691. Doi: 10.1021/acs.est.5b05478.

Magnussen K, Norén F. 2014. Screening of microplastic particles in and down-stream of a sewage treatment plant. Report C55. IVL Swedish Environmental Research Institute.

Mintenig S, Int-Veen I, Löder M, Gerdts G. 2014. Mikroplastik in ausgewählten kläranlagen des Oldenburgisch-Ostfriesischen wasserverbandes (OOWV) in Niedersachsen. Probenanalyse mittels Mikro-FTIR spektroskopie. Alfred-Wegener-Institut for Oldenburgisch-Ostfriesischer Wasserverband (OOWV).

OECD. 2004. OECD guideline 222 – Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, s. 1-18. Doi: 10.1787/9789264070325-en.

Palmqvist A, Aagaard Larsen I. 2018. Milekomposterings påvirkning af indhold og type af mikroplast partikler i spildevandsslam. Genanvend Biomasse (forventes offentliggjort primo 2019).

Rillig MC. 2012. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil? *Environmental Science and Technology* 46, 6453-6454. Doi: 10.1021/es302011r.

Rillig MC, Ingraffia R, Machado AAdS. 2017. Microplastic incorporation into soil in agroecosystems. *Frontiers in Plant* Science 8, Article 1805. Doi: 10.3389/fpls.2017.01805.

Rodriguez-Seijo A, Lourenco J, Rocha-Santos TAP, da Costa J, Duarte AC, Vala H, Pereira R. 2017. Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia Andrei* Bouche. Environemntal Pollution 220, 495-503. Doi: 10.1016/j.envpol.2016.09.092.

Vollertsen J, Hansen AA. 2017. Microplastic in Danish wastewater – Sources, occurences and fate. Environmental Project No. 1906. The Danish Environmental Protection Agency. ISBN: 978-87-93529-44-1

Weithmann N, Möller JN, Löder MGJ, Piehl S, Laforsch C, Freitag R. 2018. Organic fertilizers as a vehicle for the entry of microplastic into the environment. *Science Advances* 4, eaap8060. Doi: 10.1126/sciadv.aap8060.

Zubris KAV, Richards BK. 2005. Synthetic fibers as an indicator of land application of sludge. *Environmental Pollution* 138, 201-211. Doi: 10.1016/j.envpol.2005.04.013

10 BILAG

BILAG 1: FORKLARING AF FORKORTELSER, DEFINITIONER OG BEGREBER

Akklimatisere, vænne sig til et nyt miljø, i dette tilfælde til laboratorieforholdene

ANOVA, variansanalyse (Analysis of Variance), statistisk metode som benyttes til sammenligning af middelværdier for to eller flere grupper

Biopulp, organisk materiale/ affald (typisk husholdningsaffald) neddelt i et forbehandlingsanlæg

Censustid, eller optællingstid. De udvalgte tidpunkter hvor de valgte endpoints opgøres/måles

C:N ratio, forholdet mellem kulstof og nitrogen i en prøve

CRUCIAL, forsøgsanlæg i Taastrup, som drives af Københavns Universitet

Eksponerings studium, i denne sammenhæng brugt om økotoksikologisk studium, hvor forsøgsorganismerne bliver udsat for to eller flere behandlinger (herunder oftest mindst 1 kontrol behandling), for at undersøge eventuelle effekter af behandlingerne.

Endpoint, parameter der måles for at undersøge dens eventuelle afhængighed af en given behandling. I dette projekt parametrene overlevelse, vækst, adfærd og reproduktion

JB-4 og **JB-5**, klassificering af jordtyper anvendt indenfor dansk landbrug. JB-4 er klassificeringen for fin sandblandet lerjord mens JB-5 er klassificeringen for lerjord.

Mikroplast, plastpartikler mindre end 5 mm på alle leder (ofte i praksis partikler som ikke tilbageholdes på en 5 mm sigte)

Milli-Q vand, vand filtreret gennem et 0,22 µm membran filter

NPK, kunstgødning indeholdende plantenæringsstofferne nitrogen, fosfat (phosphor) og Kalium

PE, plast af polymertypen polyethylen. Kan være af highdensity (HD-PE) eller low-density (LD-PE) typen

PMMA, plast af polymertypen polymethylmethacrylat. Bliver også kaldt akryl og plexiglas

Positiv kontrol, en behandling som vides eller forventes at forårsage en effekt på det eller de endpoint(s) der måles. I nogle forsøg benyttes en positiv kontrol for at sikre at forsøget har virket. I dette projekt er de positive kontroller medtaget fordi det forventes at den tilsatte plastikmængde er så høj at en evt. manglende effekt betyder at det vil være usandsynligt at en effekt vil forekomme under realistiske miljøforhold med mindre andre miljøfaktorer også spiller ind

Spike, kunstig tilsætning af et stof, i dette tilfælde mikroplastpartikler, til en behandling

Standard afvigelse, et udtryk for variansen af målingerne omkring en middelværdi

TC, total carbon. Den totale mængde kulstof i en jordprøve. Måles ved hjælp af CHN-analyse af prøver tørret i 24 timer ved 60 °C

Terrestrisk, knytte til jordmiljøet (i modsætning til akvatisk)

TN, total nitrogen. Den totale mængde nitrogen i en jordprøve. Måles ved hjælp af CHN-analyse af prøver tørret i 24 timer ved 60 °C

TOM, totalt organisk materiale. Indholdet af volatilt organisk materiale. Måles som glødetab som procent af tørvægt ved udglødning af tørrede prøver ved 550 °C i 2 timer

WHC, Water holding capacity (vandbæreevnen). Måles ved at måle forskellen på en jordprøve når den er hhv. vandmættet og helt tørret

BILAG 2: STATISTIK PÅ JORDKARAKTERISERING

Tabel B2.1 og B2.2 angiver de parvise forskelle i hhv. jordkarakteristika og metalkoncentrationer mellem to behandlinger i henhold til Tukey HSD test som blev udført når en ANOVA viste at der var signifikante forskelle mellem behandlingerne. Når en jordparameter (pH, TOM, TC, TN; WHC) eller et metal (Cu, Cr, Ni, Zn, Ag, Cd, Pb) er skrevet ind i en celle i tabellen betyder det at den pågældende parameter/metal er statistisk signifikant forskellig mellem de to behandlinger der udspænder den pågældende celle i tabellen.

Tabel B2.1. Statistisk signifikante forskelle i jordkarakteristika mellem de forskellige jordtyper fra CRUCIAL marken.

	Slam	**Slam Acc**	**HHA**	**HHA Acc**	**Kvægmøg**	**NPK**
Slam Acc	pH, TOM					
HHA	TOM	pH, TOM				
HHA Acc	pH, TOM, TC, TN, WHC	pH, TOM, TC, TN	TOM, TC, TN			
Kvægmøg	TOM		pH, TOM	pH, TOM, TC, TN		
NPK	TOM	TOM	pH, TOM	pH, TOM, TC, TN, WHC	TOM	
Ugødet	pH, TOM	TOM	pH, TOM	pH, TOM, TC, TN, WHC	TOM	TOM

Tabel B2.2. Statistisk signifikante forskelle i metalkoncentrationer mellem de forskellige jordtyper fra CRUCIAL marken.

	Slam	**Slam Acc**	**HHA**	**HHA Acc**	**Kvægmøg**	**NPK**
Slam Acc	Cu, Zn, Ag					
HHA	Zn, Ag	Cu, Ni, Ag				
HHA Acc	Cu, Ni, Zn, Ag	Cu, Ag	Cu, Ni			
Kvægmøg	Cu, Ag	Ag, Pb	Cu, Pb	Cu, Ni, Zn, Ag, Pb		
NPK	Ag	Cu, Zn, Ag, Pb	Pb	Cu, Zn, Ag, Pb	Cu	
Ugødet	Cr, Ni, Ag	Cu, Cr, Ni, Ag, Cd	Cr, Ni	Cu, Cr, Zn, Cd	Cu, Cr, Ni	Cr, Ni

BILAG 3: KRITISKE SPØRGSMÅL OG SVAR OM MIKROPLAST I BIOGØDNING OG ANDEN AFFALDSBIOMASSE TIL JORDBRUGSFORMÅL

Er der *fare* (hazard) relateret til mikroplast forekomst i organiske ressourcer til jordbrugsformål? Og i givet er det så sandsynligt at denne fare resulterer i en risiko for centrale jordbundsorganismer?

Hvorfor er dette problem relevant?

Flere internationale og danske studier af mikroplast forekomst og skæbne i spildevand har konkluderet at den største del af de spildevandsbårne mikroplast partikler sedimenterer ud i slamfraktionen under behandling af spildevandet på rensningsanlægget. En andel af slammet anvendes som biogødning på landbrugsjord, og mikroplasten tilføres dermed til det terrestriske miljø gennem denne aktivitet. Den tilgængelige litteratur omkring effekter på primært akvatiske organismer er ikke konklusiv, idet dele af litteraturen peger på negative effekter ved miljørealistiske koncentrationer, mens andre dele af litteraturen slet ikke har fundet effekter eller har kun fundet negative effekter ved milkroplast koncentrationer der er højere end hvad der må forventes at være miljørealistisk. Men uanset om der er effekter på dyr, planter eller mennesker er det naturligvis relevant at vide om der kan gøres noget for at reducere tilledning af mikroplast til miljøet.

Kritiske spørgsmål og svar

1. *Tilføres der mikroplast til landbrugsjord ved anvendelse af biogødning og anden affaldsbiomasse?*
   Flere undersøgelser (f.eks. Mintenig et al, 2014; Magnussen & Norén, 2014; Vollertsen & Hansen, 2017; Palmqvist & Aagaard Larsen, 2018; Ljung et al, 2018; Weithmann et al, 2018; Lundbøl Vestergaard et al, 2018) har vist at både biogødning (spildevandsslam), komposteret spildevandsslam og biopulp samt digestat fra udrådning af kildesorteret organisk husholdningsaffald indeholder mikroplast i betragtelige mængder. Det betyder, at det ikke kan undgås, at der tilføres mikroplast til landbrugsjord ved anvendelse af gødningsprodukter baseret på f.eks. biogødning og kildesorteret organisk husholdningsaffald. Der er dog også andre kilder til både makro- og mikroplast forekomst på landbrugsjord, f.eks. anvendelse af landbrugsplast til overdækning af tidlige afgrøder, luftbåren deposition af støv indeholdende mikroplast partikler, og generel henkastning af affald i det terrestriske miljø. Der er på nuværende tidspunkt ingen viden om de relative bidrag fra forskellige kilder til mikroplast i det terrestriske miljø, inklusiv landbrugsjord.

2. *Er det sandsynligt at mikroplast ophobes på landbrugsjord ved anvendelse af biogødning og anden affaldsbiomasse?*
   Den generelle antagelse er at plastik, inklusiv mikroplastik, har lang nedbrydningstid i miljøet. Et studium (Zubris & Richards, 2005) viste at syntetiske fibre kunne genfindes i jord mere end 5 år efter at gødning med spildevandsbaserede gødningsprodukter var stoppet, hvilket understøtter denne antagelse. Da mikroplast tilføres til landbrugsjord ved anvendelse af affaldsbiomasse som gødning, og nedbrydningstiden tilsyneladende er længere end de 3 år der typisk mindst går mellem to på hinanden følgende tilførsler af gødning baseret på affaldsbiomasse, er det sandsynligt at der vil ske en ophobning af mikroplast i miljøet ved anvendelse af affaldsbiomasse som gødning. Der er dog ingen indikation i den publicerede litteratur, på hvor lang nedbrydningstiden af mikroplast i det terrestriske miljø kan antages at være. Så for at svare mere præcist på graden af ophobning af mikroplast ved anvendelse af affaldsbiomasse som gødning, vil det være nødvendigt at foretage undersøgelser af nedbrydningsvej og nedbrydningstid af plastemner i det terrestriske miljø.

3. *Har mikroplast negative effekter på vigtige jordbundsorganismer?*
   Der er på nuværende tidpunkt kun tilgængelig information om potentielle effekter af mikroplast på fire regnormearter nemlig *Aporrectodea caliginosa*, *Eisenia veneta*, *Eisenia andrei* og *Lumbricus terrestris*. For tre af arterne *A. caliginosa* (Palmqvist et al., 2019 (nærværende rapport)), *E. veneta* (Karling, 2018) og *E. andrei* (Rodriguez-

Seijo et al., 2017) blev der ikke fundet negative effekter på overlevelse, vækst eller reproduktion ved langtidseksponering til jord tilsat mikroplast i koncentrationer på op til 0,1 % på vægtbasis. For den fjerde regnormeart, *L. terrestris* (Lwanga, 2016), blev der fundet reduceret overlevelse og vækst (men ingen effekter på reproduktion) ved eksponering til føde (førnelag på jordoverfladen) tilsat mikroplast. I dette studium var eksponeringskoncentrationerne og den lavest observerede effektkoncentration (28% på vægtbasis) dog højere end hvad der må forventes at være en realistisk mikroplastkoncentration på almindelig landbrugsjord, i henhold til værdier målt af Vollertsen & Hansen (2017) og Ljung et al. (2018). Ved eksponering af *E. andrei* til mikoplast fandt forfatterne til det studium (Rodriguez-Seijo et al., 2017) endvidere histopatologiske effekter, i form af forstoppelse, arvævsdannelse og inflammation på ormenes tarmvæv, ned til en mikroplast koncentration på ca. 0,01% på vægtbasis, men også denne koncentration er højere end de værdier på max. 50 mg/kg der til dato er målt i og publiceret for jordprøver (Vollertsen & Hansen, 2016; Ljung et al, 2018). Med baggrund i den forhåndenværende viden om mikroplast forekomst i landbrugsjord, er der altså ikke nogle af disse studier som umiddelbart giver anledning til at antage, at der er en risiko for regnormebestanden forbundet med anvendelsen af organiske ressourcer til jordbrugsformål. Da der ikke findes publicerede studier af mikroplast effekter på andre relevante jordbundorganismer, kan det dog ikke endeligt konkluderes om det er sandsynligt at mikroplast i organiske ressourcer vil udgøre en risiko for jordbundsorganismer generelt ved anvendelsen af organiske ressourcer til jordbrugsformål.

4. *Kan jordbundsorganismer detektere og undvige mikroplast?*
   I et antal undvigeforsøg med regnorme af arterne *Aporrectodea caliginosa* (Grå orm) og *Eisenia veneta* (kompost orm) blev det undersøgt om ormene kan detektere og undvige mikroplast. Forsøgene viste at orme er i stand til at detektere mikroplast, i hvert fald når det er tilstede i relativt høje koncentrationer (0,1 vægtprocent), men indikerede at fødemængde og -kvalitet er vigtigere for ormenes valg af habitat end tilstedeværelsen af mikroplast i jorden. Kun når fødemængde og -kvalitet var den samme i de to jordtyper, ormene fik mulighed for at vælge imellem, valgte ormene (*E. veneta*) at undvige den jordtype som indeholdt større mængder mikroplast (Palmqvist et al, 2019 (nærværende rapport)).