

BIOLOGISKE METODER FOR NEDBRYTING AV MEDISINRESTER I GJØDSEL

Forprosjekt RFF-Midt-Norge

Reidun Pommeresche, Kirsty Mckinnon, Kristin Sørheim, Ola Svahn, Erland Björklund og
Sissel Hansen



TITTEL:

BIOLOGISKE METODER FOR NEDBRYTING AV MEDISINRESTER I GJØDSEL

TITLE:

BIOLOGICAL METHODS FOR DEGRADING PHARMACEUTICAL RESIDUES IN MANURE

FORFATTERE/AUTHORS

REIDUN POMMERESCHE, KIRSTY MCKINNON, KRISTIN SØRHEIM, OLA SVAHN, ERLAND BJØRKLUND, SISSEL HANSEN

DATO/DATE:	RAPPORT NR./NO	TILGJENGELIGHET/AVAILABILITY:	PROSJEKT NR./PROJECT NO.	SAKSNR./ARCHIVE NO.
22.12.2017	2/11/2017	ÅPEN /OPEN	269343/3075	
ISBN-NR./ISBN-NO:	ISBN DIGITAL VERSJON/ ISBN DIGITAL VERSION:	ISSN-NR./ISSN-NO:	ANTALL SIDER/ NO. OF PAGES:	ANTALL VEDLEGG/ NO. OF APPENDICES:
978-82-8202-045-9			28	0

NORGE, MØRE OG ROMSDAL, TINGVOLL, NORSK SENTER FOR ØKOLOGISK LANDBRUK (NORSØK), 2017

OPPDRAKSGIVER/EMPLOYER:

REGINALE FORSKNINGSFOND MIDT-NORGE, FORPROSJEKT

KONTAKTPERSON/CONTACT PERSON:

REIDUN POMMERESCHE

STIKKORD/ KEYWORDS:

KOMPOST, MEDISINRESTER, HESTEGJØDSEL, GJØDSELMED

FAGOMRÅDE /FIELD OF WORK

KOMPOST OG JORD

SAMMENDRAG

Det er lite kunnskap om medisinrester i norsk hestemøkk. I dette prosjektet har vi videreutviklet en analysemetode som kan analysere for ulike antibiotika og parasittmidler i samme prøve. Metoden er utviklet og testet slik at den kan brukes på fast substrat som hestemøkk. Hestemøkk fra medisinerte hester og hestemøkk tilsatt kjente mengder medisin ble kompostert ute i en ranke bestående av hestemøkk og nyslått gras. I et potteforsøk, ble noe av hestemøkken fra medisinerte hester tilsatt kompostmeitemark for å se hvordan de bearbeidet medisinrestene.

- Flere medisinerte til husdyr ble vurdert i starten og det er utviklet analysemetode for flere virkestoffer i medisinerte mest vanlig brukt til hest. Antibiotikumet Tribissen vet inj med virkestoffene trimetoprim og sulfadiazin, og parasittmidlene Panacur med virkestoffet fenbedazol, og Banminth med virkestoffet pyrantelmonat til hest, ble med i hele forprosjektet. 70 prøver av hestemøkk og hestemøkkkompost ble analysert. Vi fant at man kan analysere tørket hestemøkk fra medisinerte hester, prøvene trenger dermed ikke frysetørkes for videresending til analyse. Analysemetoden kan brukes for å analysere alle 4 virkestoffene samtidig.

- Det er høyest restinnhold i hestemøkk 1-2 dager etter at hesten er behandlet, men litt ulikt for hvert stoff. Deretter reduseres mengden raskt i møkk fra hestene. Nedbrytingen av medisinerte tar tid i de komposteringsmetodene som ble testet. I rankekomposten avtok innholdet av medisinerte utover i perioden på 60 dager. Det var litt ulike nedbrytingskurver for de ulike stoffene. Tre av stoffene var det enda rester av i komposten etter 60 dager. Forsøket med bruk av kompostmeitemark må optimaliseres og gjøres på nytt, mellom annet fordi mange av meitemarkene døde i ledd med ubehandlet hestemøkk.

- Våre utprøvinger viser at møkk fra behandla hester bør skilles fra annen møkk de første 1-3 dagene etter behandling. Det må utvikles håndteringsstrategier for denne møkka slik at den kan brukes trygt i plantedyrking. Det må flere utprøvinger til mht omdanningshastighet av medisinrester ved ulike komposteringsmetoder. Både temperaturutvikling, størrelsen på kompostranken, fuktighetsforhold og overlevelse av kompostmeitemark er viktige faktorer som vi må vite mer om under norske forhold. Innholdet i urin ble ikke testet.

- Vi gjennomførte en spørreundersøkelse om jord og gjødsel blant 100 hagesenterkunder. Den viste at det er en viss interesse for torvfrie, lokalproduserte jord- og gjødselprodukter, rundt halvparten av de spurte var villige til å betale 20 % merpris for et slikt produkt. Undersøkelsen viste at forbrukerne ønsket jord og gjødsel som er næringsrik og hvor ett produkt kan brukes til flere formål.

- Dette prosjektet har hatt stor betydning for samarbeidspartene ved å utvikle analysemetode for

medisinrester i fast hestemøkk, videre har vi lagt et grunnlag for å videreutvikle hestegjødsel som et produkt uten medisinrester.

SUMMARY

There is not much knowledge about pharmaceutical residues in Norwegian horse manure. In this project we have further developed a method that enables the analysis of various antibiotics and anthelmintics in a single sample. The method is designed for the analysis of solid substrates, such as horse manure. Manure from treated horses and horse manure with additions of controlled amounts of medicines were composted outdoors in a windrow consisting of horse manure and freshly cut grass. In a pot trial earthworms were added to some of the manure from the treated horses to study the effect of worm action on the biodegradation of pharmaceutical residues.

- At the start of the project, several veterinary medicines were considered. The developed analysis method covers several active ingredients in the most commonly used equine medicines. The antibiotic Tribissen vet inj with the active ingredients sulfadiazine and trimethoprim, and the equine anthelmintics Panacur (active ingredient fenbendazole) and Banminth (active ingredient pyrantel embonate) were included in the entire preliminary study. In total, 70 samples of horse manure and horse manure compost were analysed. We found that dried manure from treated horses could be analysed directly, thus making it unnecessary to freeze-dry samples prior to sending them further for analysis. The method can be used to analyse all four active ingredients at the same time.

- Contents of pharmaceutical residues in horse manure are highest 1-2 days after the horse has been treated, with some variation between substances. After this peak, residue contents in manure decrease rapidly. Degradation of the added medicines was slow in the composting trials. In the compost windrow, the contents of medicines decreased gradually throughout a 60-day period, with slightly different degradation curves for the various substances. Three of the tested active ingredients were still detectable in the compost after 60 days. The earthworm trials have to be improved and repeated, among other things, because many worms died in the untreated horse manure plots.

- Our trials show that manure from treated horses should be kept apart from other manure for the first 1-3 days after medical treatment. Strategies for the management of such manure have to be developed so that this resource can be used safely in plant production. Additional studies are needed to assess the degradation rate of pharmaceutical residues using different composting methods. Important factors that need to be studied in greater detail under Norwegian conditions include temperature development, windrow dimensions, moisture conditions and earthworm survival. We did not study the contents of pharmaceutical residues in urine.

- We performed a survey on soil and fertilizer products among 100 garden centre customers. The results showed that there is a certain interest for peat-free, locally produced soil and fertilizer products. Approximately half of the respondents replied that they are willing to pay as much as 20 % more for such products. Consumers preferred soil amendments that contain nutrients and are typically "all-purpose", i.e. a single product that can be used across a wide range of applications.

- This project has been important for the project partners due to its development of an analysis for pharmaceutical residues in solid horse manure. Furthermore, it provided a basis for the further development of horse manure as a pharmaceutical residue-free product.

GODKJENT /APPROVED

TURID STRØM

PROSJEKTLEDER /PROJECT LEADER

SISSEL HANSEN

Forord

Norsk senter for økologisk landbruk (NORSØK) og analyselaboratoriet MoLab ved Høgskolan Kristianstad har gjennom dette forprosjektet arbeidet med å skaffe mer kunnskap om medisinrester i hestegjødsel, biologisk nedbrytning av disse og utvikling av analysemetoder. Sammen med Hageland Surnadal har vi gjennomført en markedsundersøkelse for å undersøke kjøpe- og betalingsvilligheten for eventuelle nye jordprodukter basert på lokal hestegjødsel. Arbeidet har gitt mange erfaringer og ny kunnskap, og har posisjonert aktørene til å jobbe videre med å utvikle løsninger for analyser og håndtering av gjødsel med medisinrester.

Prosjektet er finansiert av Regionalt forskningsfond Midt-Norge og Fylkesmannen i Møre og Romsdal, i tillegg til at samarbeidspartene har bidratt med en betydelig egeninnsats.

NORSØK takker Regionalt forskningsfond Midt-Norge og Fylkesmannen i Møre og Romsdal for støtten, og samarbeidspartene for godt og konstruktivt samarbeid i prosjektet.

English

In the preliminary study "Biological methods for degrading pharmaceutical residues in manure" (2017), the Norwegian Centre for Organic Agriculture and MoLab at Kristianstad University in Sweden have provided more knowledge about pharmaceutical residues in horse manure and the biodegradation of the residues in composts with and without earthworms. Furthermore, a method for analysing pharmaceutical residues in manure was developed. Together with a local garden centre in Surnadal, we performed a market survey to assess customers' willingness to pay for new soil amendments based on local horse manure.

The project was funded by the Regional Research Fund of Central Norway and the County Governor of Møre og Romsdal, with significant in-kind contributions from the project partners.

Tingvoll 22.12.2017

Reidun Pommeresche

Innhold

Forord	4
Innhold.....	5
Innledning.....	6
Valg av medisiner og egenskaper.....	6
Metodeutvikling for måling av medisinrester i hestemøkk	9
Metodeutvikling knyttet til analyseprosessen	9
Ekstraksjon og videre analyser av prøver.....	11
Oppsummert	11
Utprøvinger	12
Forundersøkelser og vurderinger.....	12
Material og metode utprøvinger	13
Klargjøring av prøver.....	13
Uttak av prøver til analyse	14
Analyse.....	15
Temperaturmålinger	15
Opplegging av kompostranke	15
Potter med meitemark – klargjøring og oppfølging	16
Resultat og diskusjon	17
Utskilling av medisinrester i fast hestegjødsel.....	17
Kompostranke.....	17
Nivåendringer over tid av medisinrester i fersk møkk og i kompostranken.....	18
Potter med meitemark	20
Markedsundersøkelse om jord og gjødsel	22
Metode.....	22
Resultater og diskusjon	22
Problemstillinger for videre arbeid	25
Referanser	26

Innledning

Husdyrgjødsel og avløpsvann som inneholder rester av antibiotika, kan føre til forurensning av dyrkingsjord, med fare for utvikling av antibiotikaresistens, forstyrret plantevekst og uheldige effekter på organismer i jorda (Liu mfl. 2009, Heuer mfl. 2011). Resistensutvikling mot legemidler gir økt risiko for ikke å kunne behandle alvorlige sykdommer hos mennesker og dyr (Boxall mfl. 2003). Det foreligger få data om virkninger av veterinære legemidler i norsk, dansk og svensk husdyrgjødsel, men noen har undersøkt problemstillingen og samlet en del litteratur (Halling Sørensen mfl. 2002, Serikstad mfl. 2012, de Boer 2017). Internasjonalt er det publisert flere studier om veterinærmedisiner i husdyrgjødsel, hvor mye om antibiotika er oppsummert i de omfattende artiklene fra Sarmah mfl. 2006 og Masse mfl. 2014. Vi finner lite som omhandlet parasittmidler.

Mesteparten av tilførte medisiner til et dyr skilles ut i gjødsel og urin. Det er derfor viktig å undersøke husdyrgjødsel for slike midler (Heuer mfl. 2011). Halveringstider for nedbrytning i miljøet for veterinærmedisiner oppgis gjerne fra forsøk under laboratorieforhold (20-25 °C). Under norske forhold vil nedbrytningstider kunne forlenges på grunn av langt lavere temperatur. Det kan dermed være så høge konsentrasjoner av enkelte medisinrester i gjødsel at det er nødvendig med bearbeiding hvis den skal brukes som gjødsel på jord. Noen studier har undersøkt nedbrytning av legemidler etter behandling av gjødselen (Hansen mfl. 2012, Kim mfl. 2012, Youngquist mfl. 2014). Kim mfl. 2012 fant at innholdet av sagflis i komposteringen påvirket nedbrytingen av de stoffene de undersøkte svært mye og ulikt for de forskjellige stoffene. Det er derfor fortsatt mangelfull kunnskap om nedbryting av medisinrester i gjødsel.

I dette forprosjektet har vi undersøkt innholdet av noen av de mest brukte veterinærmedisinene i gjødsel fra behandla hester. Forprosjektet har arbeidet med metodeutvikling for måling av medisinrester i hestegjødsel, med sikte på å utvikle en multi-analysemetode for medisinrester i fast substrat. Videre har vi gjort en pilotstudie av ulike behandlingsmåter av gjødsel under midt-norske forhold.

Vi har valgt hestegjødsel fordi det er en verdifull og uutnytt ressurs som i dag i stor grad er en ressurs på avveie, men som kan utnyttes bedre og gi økt verdiskaping (Malgeryd 2013). Til tross for at det er mye hestegjødsel i regionen, importeres det vekstmedium og organiske gjødselmidler til Midt-Norge, både til landbruk og hagebruk, mest torv og hønsegjødsel. Bruk av organisk gjødsel er spesielt aktuelt i økologisk landbruk, hvor det i perioder kan være en utfordring å dekke behovet for plantenæringsstoffer. Hestegjødsel har egenskaper som gjør den velegnet til gjødsel, som basis for oppallsjord og jordforbedring. Kompostert hestegjødsel fra staller i regionen kan derfor være et lokalt alternativ. Hestegjødsel som skal omsettes som gjødsel til jord- og hagebruk må ha god næringskvalitet og tilfredsstillende kravene fra Mattilsynet mht. innhold av uønskete stoffer. Forprosjektet har sett på om det finnes et marked som kan gi økt verdiskaping for hestegjødsel.

Valg av medisiner og egenskaper

For å gjøre prosjektet relevant, valgte vi ut noen av de mest vanlige typene antibiotika og parasittmidler som brukes til hest i Norge. I den innledende delen av forsøket hadde vi med handelspreparatene Tribriksen vet inj. ® (antibiotikum som inneholder trimetoprim og sulfadiazin), Panacur pasta ® (parasittmiddel som inneholder fenbendazol) og Banminth pasta ® (parasittmiddel som inneholder pyrantelmonat), Streptocillin vet inj. ® (antibiotikum som inneholder benzylpenicillin og dihydrostreptomycin) og Ivomec ® (parasittmiddel som inneholder ivermectin). Til sammen var dermed sju ulike stoffer (trimetoprim,

sulfadiazin, benzylpenicillin, dihydrostreptomycin, fenbendazol, pyrantel og ivermectin) med i første del av metodeutviklingsdelen av prosjektet. Fire virkestoffer (trimetoprim, sulfadiazin, fenbendazol og pyrantel) ble valgt ut til behandling av hestene og i tillegg med i utprøvinger med kompost. Disse fire stoffene beskrives nærmere. Mengde medisin som gis til dyret, det vil si både døgndose og lengde på behandlingstida, er omtalt. Halveringstida, det vil si den tida det tar før halvparten av stoffet er nedbrutt i kroppen, er oppgitt. Dette er samlet i Tabell 1. Dette er gjort for å gi en indikasjon på hvilke stoffer og mengder av stoffene vi kan forvente å finne i gjødsel fra behandla dyr. Virkningsmekanismen til stoffet, hvordan stoffet angriper og skader eller dreper den skadelige organismen, er beskrevet. De fleste av virkestoffene dreper ikke skadeorganismen(e) umiddelbart, og flere individer overlever ei stund før de dør og kan utvikle motstandskraft (resistens) mot virkestoffet og spre denne resistensen til nye organismer, både horisontalt og vertikalt (til andre grupper organismer eller til sine etterkommere).

Tabell 1. En oversikt over de utvalgte medisinene, dosering, halveringstid i kroppen og tilbakeholdelsesfrist for slakt (Kilde: Felleskatalogen, 2017):

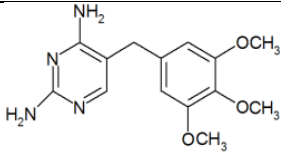
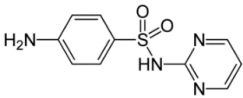
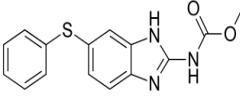
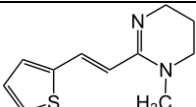
Preparat	Trimetoprim	Sulfadiazin	Fenbendazol	Pyrantelemonat
Dosering aktivt stoff/kg	12 mg/kg	2,4 mg/kg	7,5 mg/kg	19 mg/kg
Halveringstid	2-4 timer	Mer enn trimetoprim	13 timer	ukjent
Utskilles hovedsakelig	Nyrer/urin	Nyrer/urin	Avføring	Avføring
Slaktefrist	10 døgn	10 døgn	5 døgn	0

Tribriksen vet inj® inneholder trimetoprim og sulfadiazin, og er et antibakterielt middel med baktericid effekt på både grampositive og gramnegative bakterier. Det brukes til storfe, sau, geit, hest, gris og hund, både som injeksjonspreparat og som pulver eller tablett. Resistensutvikling forekommer og kan f.eks. være aktuelt ved *Escherichia coli*-infeksjoner hos gris og *Staphylococcus aureus*-infeksjoner hos hund. Sulfadiazin og trimetoprim hemmer to påfølgende prosesser i bakteriens folsyremetabolisme. Stoffene forsterker hverandre og skader bakteriene. Halveringstida (den tida det tar før konsentrasjonen er halvert i plasma) er oppgitt til 2-4 timer hos hest og storfe for trimetoprim, mens sulfadiazin har noe lenger halveringstid. Stoffene utskilles hovedsakelig via nyrene og i urinen. Middelet brukes f.eks. mot luftveisinfeksjoner, magesårinfeksjoner, nyre- og urinveisinfeksjoner. For alle dyreslag er doseringa 12 mg sulfadiazin og 2,4 mg trimetoprim per kg levende vekt en gang daglig, og behandlinga bør fortsette inntil to døgn etter symptomfrihet. Tilbakeholdelsestid for slakt er 10 døgn når preparatet gis som pulver eller tablett.

Panacur® granulat (22%) eller oralpasta (18,75%) inneholder fenbendazol og er et parasittmiddel som brukes vanlig til hest. Det hemmer karbohydratomsetningen hos nematoder (rundorm) og har toksisk virkning på nervesystemet hos cestoder (bendelorm). Stoffet virker på voksne ormer, på larver og på egg hos de fleste vanlig forekommende rundormer i mage- tarmkanalen. Stoffet er også virksomt mot lungeorm og

bendelorm. Stoffet blir i liten grad absorbert i dyrekroppen. Halveringstida er oppgitt til 13 timer hos storfe og utskillelse er i hovedsak i avføringen. Til hest brukes middelet mot rundorm og spolorm (kjønnsmodne stadier av *Parascaris*, *Oxyuris*, *Strongyloides*, store og små strongylider). For å unngå resistensutvikling bør en unngå for ofte bruk og gjentatt bruk av parasittmiddel fra samme kjemiske klasse, samt underdosering. Dosering til hest er 7,5 mg fenbendazol/kg, dvs granulat 10 g/300 kg og oralpasta 1 stempelstrek/100 kg. Tilbakeholdelsesfrist er 14 dager for slakt ved bruk av granulat og 5 dager ved bruk av oralpasta.

Banminth vet. «Zoetis»[®] oralpasta til hest inneholder pyrantelembonat. Dette er et parasittmiddel tilhørende tetrahydropyrimidin-gruppen som er effektivt mot både kjønnsmodne stadier og larvestadier av rundormer i mage-tarmkanalen. Stoffet stimulerer kolinerge nevrone hos parasitten og dermed forstyrres overføring av elektriske impulser mellom nerve og muskel og parasitten svekkes og dør. Stoffet absorberes i svært liten grad i dyrekroppen. Dosering er 19 mg pyrantelembonat pr kg kroppsvekt. Ved dosering med 38 mg/kg kan pyrantel påvises i avføring etter 3 dager, mens ved dosering med 19 mg/kg kan pyrantel ikke påvises etter 3 dager, ifølge produsent. Preparatet brukes mot voksne stadier av rundorm, særlig spolorm, strongylider, piskeorm og bendelorm. Tilbakeholdelsestid for slakt er 0 dager.

			
Trimetoprim	Sulfadiazin	Fenbendazol	Pyrantel

Formler for de stoffene som ble med både i metodeutvikling og i komposteringsutprøvinger (Wikipedia, 2017)

Metodeutvikling for måling av medisinerester i hestemøkk

Analyser av lege- og parasittmidler i et så heterogent sammensatt stoff som hestegjødsel, krever en spesielt avansert analyseteknikk innen massespektrometri, og gjøres i en maskin kalt Ultra Performance Liquid Chromatography- tandem mass spektrometer (UPLC MS/MS). I tillegg omfatter arbeidet både ekstraksjon (uttrekk av stoffene fra prøven), og kromatografi av prøvene i forkant av denne analysen. Prosjektet har testet og validert metodene og maskinene som brukes til å gjelde alle sju medikamenter (trimetoprim, sulfadiazin, benzylpenicillin, dihydrostreptomycin, fenbendazol, pyrantel og ivermectin), hvor bare 4 ble med videre i forsøket med kompostering (trimetoprim, sulfadiazin, fenbendazol og pyrantel). Hestene fikk molekylet pyrantelmononat fra medisinen, og dette stoffet ble analysert ved å gjenfinne pyrantel i prøvene. De andre virkestoffene var eksakt de samme som de molekylene det ble analysert for. Tørket hestemøkk eller tørket kompost var utgangspunktet for disse analysene.

Metodeutvikling knyttet til analyseprosessen

Første del av metodeutviklingen bestod i at vi tilsatte medisin direkte i noe hestemøkk. Vi tilsatte virkestoffene trimetoprim, sulfadiazin, fenbendazol og pyrantel direkte i avføringsprøver fra ubehandla hest og i en mengde vi antok ville tilsvare det nivået vi ville finne ett døgn etter behandling, basert på oppgitte data fra produsenten (Ref. Felleskatalogen). Formålet med dette var å se om analysemetoden påviste stoffene i forventa mengde i forhold til tilsatt mengde og om metoden egnet seg for å analysere det forventa nivået av medisinene etter behandling med normal dosering. For å hindre mikrobiell eller kjemisk omdanning av prøvene under lagring og transport, måtte prøvene behandles enten ved frysetørking eller andre metoder. Vi valgte å tørke i tørkeskap ved 70-80 °C til stabil vekt før disse prøvene ble sendt tørre til bruk i metodeutvikling og analyse.

I et massespektrometer av typen «trippelkvadropol» filtreres emnene i tre ulike steg. Først filtreres de etter molekylmasse. I neste steg «knuses» molekylene i ulike fragmenter med ulik masse ved kollisjon med argongass med kjent energimengde. De knuste molekylene får en unik sammensetning av fragmenter (biter) nesten som et fingeravtrykk. I det tredje steget filtreres de fragmentene vi ønsker å undersøke, vanligvis to fra hvert molekyl, og de blir videre navngitt, og innholdet måles. Ett av fragmentene brukes for å bestemme hvilket og hvor mye av molekylet som fins i prøven, mens den andre fragmentdelen brukes som en ekstra sikkerhet og sjekk for at stoffet finnes i prøven.

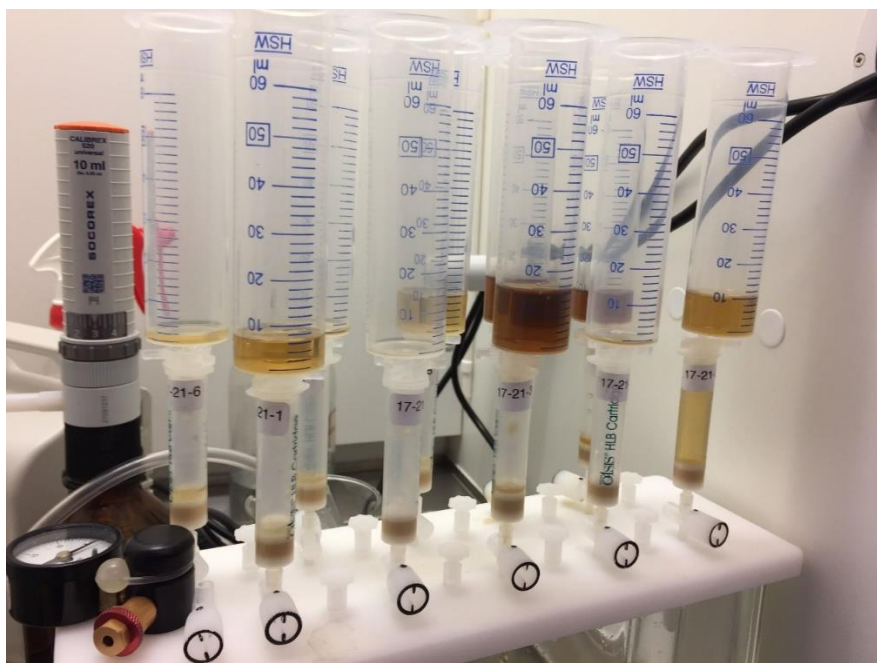


Sluttanalysen skjer i denne maskinen, Ultra Performance Liquid Chromatography- tandem mass spectrometer (UPLC MS/MS), som består av to komponenter, en væskrokromatograf og et massespektrometer.

Ekstra trinn med væskekromatografi

Massespektrometri kombineres ofte med væskekromatografi, som separerer stoffene som skal analyseres. Massespektrometer er veldig følsomme for de stoffene vi skal analysere, men dessverre også for forstyrrende bakgrunnsstoffer. I dette prosjektet har bakgrunnsstoffer av ulike typer nedbrutt organisk materiale i hestegjødsel vært ekstra utfordrende å skille fra de medisinstoffene vi ønsker å undersøke innholdet av. Det er derfor utviklet ett ekstra trinn innen væskekromatografi for å gjøre det som skal analyseres enda renere før det settes i analysemaskinen.

For å frigjøre de stoffene vi vil analysere for fra hestemøkken med så lite medfølgende bakgrunnsstoffer som mulig, har vi brukt varmtvannstraksjon i dette prosjektet. Teknikken bygger på at vannets kjemiske og fysiske egenskaper endrer seg når temperaturen økes. Vannet får ved oppvarming nesten like egenskaper som organiske løsningsmidler. Teknikken passer bra for polare og semi-polare stoffer som vi har i dette prosjektet. De frigjorte stoffene gjennomgår så en Solid Phase Extraction (SPE). Gjort riktig så festes stoffene seg på SPE-kolonnen, og baggrunnsstoffer og liknende stoffer passerer uten å feste seg (se bildet under). Dette renser prøven for andre stoffer og oppkonsentrerer de stoffene vi ønsker å ha med videre.



Eksempel på prøver av hestemøkk i væskeform som gjennomgår en "rensing" ved å filtreres gjennom en spesiell masse. Væsken med ulike stoffer ses i sprøytedelen av oppsette og suges gjennom et "filter" i bunnen av rørene som sprøytene står i, kalt Solid Phase Extraction (SPE -kolonne). I disse rørene med filtermasse fester de stoffene seg som skal med videre i analysen, resten renner forbi.

Multianalyse

For hvert nytt stoff optimeres og kalibreres maskinens parameter mht fragmentvalg og kromatografi for å optimalisere følsomheten, dvs. få så lav grense som mulig for å gjenkjenne stoffene (Limit of Quantification, LOQ). Når det er gjort, kan metodene i forkant sammen med maskinen analysere for flere innholdsstoffer samtidig. Den fleksible og robuste «sluttanalysen» er både kromatografi og massespektrometri i samme prosess som gjøres på en maskin Ultra Performance Liquid Chromatography- tandem mass spektrometer (UPLC-MS/MS). Denne kjeden av ulike steg før og inkludert i analysemetoden er utviklet av Ola Svahn og Erland Björklund og publisert i *Journal of Chromatography B* (Svahn & Björklund, 2016), i tillegg til i avhandlingen *Tillämpad miljöanalytisk kemi för monitorering och åtgärder av antibiotika- och läkemedelsrester i Vattenriket*, Svahn 2016. Metoden er godkjent tilsvarende metoden fra 2007 laget av det

amerikanske miljøverndepartementet (US EPA) for analyser av legemidler og personlige hygieneprodukter i vann, jord, sediment og biomaterialer ved bruk av HPLC-MS/MS7 (Method 1694, 2007).

Ekstraksjon og videre analyser av prøver

Da metodeutviklingen var gjennomført og analysemaskinen var klargjort, kunne innholdet av de fire utvalgte stoffene, trimetoprim, sulfadiazin, pyrantel og fenbendazol bestemmes i samme prøve med utgangspunkt i tørre prøver av 1. hestemøkk og 2. kompost med hestemøkk. Til sammen i hele prosjektet er 70 prøver analysert. Prosedyren fra start til analyse var i korte trekk denne. Tørket prøve ble knust smått og pakket inn i et filterpapir. Stoffet ble så løst opp og ut i vann (ekstrahert) ved å helle varmt vann (100°C) over filterpapir med møkk i. Etter 30 minutter ble en del av væsken brukt videre. Væske ble tatt over i et oppsett med prøverør og kromatografmateriale, se bildet over. Den kromatograftypen som ble brukt, er en SPE (Solid Phase Extraction) av typen HLB (Hydrofil-Lipofil Balansert) av merket Oasis HLB (200 mg).

Stoffene som var i kromatografikolonnen ble rensert i ulike trinn og det ble tilsatt interne standardstoffer som trengs for at analysen skal kunne gjennomføres. Prøvene ble så analysert i den såkalte «sluttanalysen» i selve maskinen. Ved sluttanalyse ble de fire stoffene som vi skulle analysere for separert (skilt fra hverandre) og oppkonsentrert i kromatografisteget i maskinen. Etter separasjonen, ble mengden stoff kvantifisert i spektrometerdelen av maskinen.

Oppsummert

Metodeutviklingen gjør at man i sluttanalysen kan analysere for ulike medisinske stoffer samtidig i hestemøkk og kompost (fast substrat), og vi trenger ikke å analysere for ett og ett stoff slik det er vanlig å gjøre. Dette vil gjøre videre analyser av medisinrester i prøver betydelig mindre arbeidskrevende.

Metoden slik den er utviklet og godkjent til nå, gjør at den først og fremst kan brukes til relative sammenlikninger, slik som i dette prosjektet. For å kvalitetssikre og godkjenne metoden for kvantifisering av ukjente stoffer i hestemøkk, kreves ytterligere metodeutvikling og validering/kalibrering. Den er ikke helt finjustert på lave stoffmengder enda. Det er fint mulig å bruke tørkede hestemøkk og kompostprøver til disse analysene i stedet for at de sendes frysetørket.

Nedre grense for hva den utviklede analysemetoden kan kvantifisere av stoffer kalles Limit of Quantification (LOQ). Genesene for stoff/g tørrstoff er 0,007 µg trimetoprim /g tørr hestemøkk, 0,06 µg/g sulfadiazin, 0,03 µg/g fenbendazol og 0,002 µg/g pyrantel.

Utprøvinger

Etter at metodeutviklingen for analysering av medisinrester i hestemøkk var gjennomført, og etter at vi hadde vurdert og testet biologiske metoder for nedbryting av medisinrester, ble følgende utprøvinger gjennomført:

- Utskilling av medisinrester i fast hestegjødsel
- Nedbrytning av medisinrester i kompostranke med hestegjødsel
- Nedbrytning av medisinrester i hestegjødsel med meitemark, potteforsøk

Forundersøkelser og vurderinger

Et mål i prosjektet var å gjennomføre småskala forsøk og undersøke hvordan utvalgte og relevante biologiske behandlingsmetoder av hestegjødsel innvirker på restnivå av aktuelle antibakterielle og antiparasittære midler i hestemøkk under midt-norske forhold. Ulike metoder for aerob og anaerob kompostering ble vurdert.

Anaerob metode

Som anaerob metode vurderte vi fermentering i biogassreaktor. Meningen var å etterlikne det som skjer i en «fermenteringstank» i et biogassanlegg på en gård. Massene der har tørrstoffinnhold (TS) på ca 5 %, og komposteringen skjer uten tilgang på oksygen (anaerobt). Ønsket var å bruke 4 testreaktorer som tar 20 liter hver. Det viste seg å bli arbeidskrevende å få nok hestemøkk med medisinrester til testreaktorene. Vi vurderte derfor også muligheten av å kompostere i tette flasker ved 33°C eller 55°C. I forsøket med utvikling av metode for analysering av medisinrester, viste det seg imidlertid at vi ikke kunne bruke samme analysemetode for så tynnflytende blandinger. En annen utfordring var behovet for å pøde med metanproduserende bakterier i en biogassreaktor (bløt husdyrgjødsel i vårt tilfelle) med risiko for tilføring av eventuelle medisinrester fra kubesetningen. Anaerob fermentering i biogassreaktorer ble derfor tatt ut av prosjektet.

Aerobe metoder med og uten meitemark

Ulike småskala metoder for aerob kompostering, med og uten meitemark, ble vurdert og prøvd ut. I et rom med jevn temperatur på ca 18 °C, hadde vi hestemøkk i pottes og dunker som tok 2, 9 og 37 kg hestemøkk. For testen med kompostering uten meitemark var målet å undersøke om det var mulig å oppnå temperaturer over 55°C i et gitt antall dager, som er gitt for forskriftsmessige hygienisering av gjødsel (gjeldende ved omsetning av gjødselvarer). Det ble ikke mer enn max. 30 °C, og vi avsluttet denne utprøvingen. I en annen test av kompostering uten meitemark, var planen å bruke et klimaskap og styre fuktighet og temperaturer etter kurver som er vanlig i de ulike komposteringsfasene ved kompostering. Pottes med hestegjødsel ble dekket med topptex kompostduk og planen var å registrere TS jevnlig og tilføre vann for å holde optimal fuktighet. Klimaskapet som ble brukt, viste seg å ikke fungere for formålet, og denne testen ble heller ikke videreført. I testen med kompostering med meitemark ble 30 kompostmeitemark (voksne med belte, totalt ca 20 g) tilsatt 2 kg hestemøkk. Bakgrunnen for valgt antall er at hver meitemark kan spise sin egen vekt med organisk materiale per dag (Muroe, 2004). Da skulle alt være «spist» en gang i løpet av 67 dager. Det viste seg å være noe optimistisk, så antallet mark bør økes og mengde møkk reduseres. Kompostmarkene som vi brukte, overlevde godt i 8 uker i hestemøkk ved 18°C og vanning to ganger i uka.

Siden det ikke ble nok varmgang i pottene under testingen, valgte vi å legge opp en kompostranke ute bestående av hestemøkk og plen gras. Vi valgte å gå videre med potteforsøk med meitemark, siden meitemarkene trivdes i hestemøkk i pottes og temperaturene vi oppnådde i testingen er egnet for meitemark.

Material og metode utprøvinger

To hester oppstalla i samme besetning, **en nordlandshest (H1)** og **en fransk halvblodshest (H2)**, ble valgt ut til forsøket. Hestene fikk samme fôring, høy og litt kraftfôr, og gikk adskilt i hver sin boks inne i stall.

Det ble samlet opp hestemøkk fra hver hest før hestene ble behandla. Hestene fikk så tilført medisiner. Vi valgte å gi samme antibiotikum til begge hestene, Tribriksen[®], som inneholder virkestoffene trimetoprim og sulfadiazin. Det ble gitt ulikt parasittmiddel til de to hestene, slik at vi til sammen fikk testa fire ulike typer virkestoff. H1 fikk i tillegg til Tribriksen også Panacur[®], med virkestoffet fenbendazol og H2 fikk Banminth pasta[®], med virkestoffet pyrantelmonat i tillegg til Tribriksen. Alle doser ble gitt i forhold til levende vekt som foreskrevet i Felleskatalogen. Begge hestene fikk to doser Tribriksen, startdagen og dagen etter.

Det ble tatt ut prøver til analyser for innhold av medisinrester av hestemøkk fra begge hestene før medisinerings (dag 0, D0), og etter medisinerings fra H1 på dag 1 (D1), 3 (D3) og 5 (D5) og fra H2 på dag 2 (D2) og 5 (D5). Gjødtsel fra begge hestene ble samlet opp etter medisinerings og holdt adskilt. Fra H1 ble det samlet opp møkk på dag 1, 3 og 5 og fra H2 på dag 2 og 5. H1 hadde ikke avføring på dag 2. Planen var å bruke møkk fra dag 2 i forsøkene med rankekompost og pottes med meitemark, men siden H1 ikke hadde avføring på dag 2, ble møkk fra dag 1 for H1 og møkk fra dag 2 fra H2 brukt. Medisinrester fra hest 1 og hest 2 har ved start av forsøket derfor noe ulikt utgangspunkt. Gjødsele fra H1 dag 1, fanger i prinsippet ikke reststoffer etter dose to av Tribriksen som hestene fikk etter oppsamling av møkk på dag 1.

Hestemøkk fra ikke-medisinerte hester ble også tilsatt de samme medisinene som hestene fikk. I den ene behandlingen ble alle virkestoffene tilsatt (trimetoprim, sulfadiazin, fenbendazol og pyrantel). I den andre behandlingen ble det tilsatt fenbendazol og pyrantel. Medisinene ble tilsatt i doser tilsvarende sannsynlig utskilling i møkk fra medisinererte hester på første døgn etter behandling, basert på oppgitte egenskaper for medisinene i Felleskatalogen.

Tabell 2. Oversikt over forsøksledd i forsøkene. Møkk fra medisinererte hester og hestemøkk fra ikke medisinererte hester (ren hestemøkk) tilsatt medisiner ble brukt. Tabellen viser virkestoffene i medisinene, hvilke ledd som ble testet i rankekompost og hvilke som var med i pottforsøk med meitemark.

Ledd	Kompost-ranke	Møkk med meitemark	Gjentak (n)
Hest 1 (H1) behandlet med trimetoprim, sulfadiazin og fenbendazol. Møkk fra dag 1 (H1start)	x	x	3
Hest 2 (H2) behandlet med trimetoprim, sulfadiazin og pyrantel. Møkk fra dag 2 (H2start)	x	x	3
Ren hestemøkk tilsatt trimetoprim, sulfadiazin, fenbendazol og pyrantel	x		3
Ren hestemøkk tilsatt fenbendazol og pyrantel	x		3
Ren hestemøkk fra Hest 1		x	3

Klargjøring av prøver

Ren hestemøkk fra Hest 1 (H1D0) ble revet opp til små biter med hendene og blandet godt. Vi tok ut en prøve på ca 100 g til analyse. Videre veide vi opp 3 kg av H1D0 og 3 kg av H2D0 og satte bøttene til side, samt veide opp 1,5 kg av H1D0 til meitemarkpottene.

Hestemøkk fra medisinererte hester, Hest 1 fra dag 1 og Hest 2 fra dag 2, ble holdt adskilt. Vi brukte engangshansker og skiftet hansker og vasket bøtter ved tilberedning av de ulike prøvene for å hindre

«smitte» fra en prøve til en annen. Møkken ble revet opp og vi hadde 1 kg for hvert ledd og hvert gjentak i nylonnettingposer til kompostrankeforsøket. Det ble tatt ut ca 100 g av hver pose til analyse. Hestemøkk fra disse to leddene ble også brukt i pottforsøket med meitemark.

Tillaging av møkk tilsatt medisiner: blandet 3 kg fersk møkk fra H1D0 og 3 kg H2D0 i en stor sekk og ristet og snudde på denne. Delte møkken i to bøtter med 3 kg i hver. En bøtte ble tilsatt medisin med virkestoffene trimetoprim (tilsvarende 0,16 mg/g fersk møkk) og sulfadiazin (tilsvarende 0,8 mg/g fersk møkk), fenbendazol (tilsvarende 0,111 mg/g fersk møkk) og pyrantel (tilsvarende 0,108 mg/g fersk møkk). Møkken ble så blandet, først med hendene i ca 5 minutter, deretter i en dobbel plastsekk som ble snudd og vendt. Den andre bøtta med 3 kg ble tilsatt medisin med virkestoffene fenbendazol (tilsvarende 0,111 mg/g fersk møkk) og pyrantel (tilsvarende 0,108 mg/g fersk møkk) og blandet på samme måte som over. Fordelte møkken i nettingposer og tok ut prøver til analyse som beskrevet over.

Hver nettingpose ble merket med to laminerte lapper. Den ene var knyttet til snoren på posen med en kort nylonnor, den andre med en lengre snor for å kunne ligge på utsiden av komposten. Nettingposene ble lagt i hver sin plastpose for oppbevaring i kjølerom før ilegging i komposten og for å hindre «smitte».



Bilder fra arbeidet med å forberede hestemøkk som skulle komposteres i rankekomposten. Hestemøkk slik den så ut da den var tatt ut fra stallen (t.v.), all møkk ble revet smått og gjort så homogen som mulig (midten), før den ble veid og hatt i nylonposer (t.h.).

Uttak av prøver til analyse

Fra nylonposene i kompostranken ble prøver til analyse tatt fra 4 ledd og 3 gjentak på dag 20, 40 og 60 etter at kompostranken ble anlagt og forsøket startet, kalt D20, D40 og D60. Ved uttak ble posene gravd forsiktig frem med et grep uten å flytte dem. Skiftet til ny plasthandske for hver prøve. Løste opp knuten i posen og tok ut en prøve på ca 100 g, forstyrret posen minst mulig. Ved start ble det tatt ut en samleprøve av materialet i selve ranken og blandet i en bøtte før uttak av ca 100 g for å sjekke eventuelt innhold av medisinrester. Fra pottene med meitemark ble det tatt ut prøver til analyser på dag 20 og dag 40. Det ble tatt ut ca 100 g masse fra hver potte. Antall analyser ble redusert til 2 gjentak av tre ledd pga kostnader.

Analyselaboratoriet trenger minimum 10 g tørt materiale fra hver prøve. Med tørrstoff på rundt 20 % i møkk/kompost blir det ca 100 g per prøve før tørking. Alle prøver ble tørket ved 75 °C i 33 timer (til stabil vekt) før de ble lagt i tette zip-poser i fryseskap. Prøvene ble sendt med vanlig pakkepost til analyselaboratoriet MoLab ved Krinova Incubator & Science Park ved Högkolan Kristianstad, Sverige.



Fersk prøve av hestemøkk fra en nylonpose i kompostranken (t.v.), etter tørking (midten) og hestemøkkprøver ferdigtørket og pakket for sending i zip-poser (t.h.).

Analyse

Se kapitlet om «Metodeutvikling for måling av medisinrester i hestemøkk» og protokollen (Method 1694, 2007, Svahn & Björklund 2016). Mengden virksomt stoff ble kvantifisert i spektrometerdelen av maskinen og oppgis i mikrogram per gram tørrstoff ($\mu\text{g/g TS}$).

Temperaturmålinger

For temperaturmålinger ble det brukt 3 stykk EL-USB-TC-LCD Thermocouple Data Loggere i kompostranken. I tillegg ble det gjort manuelle temperaturmålinger i komposten med en Sandberger stavmåler, både ved loggene og ved andre punkter. Samtidig med de manuelle målingene ble temperaturloggene lest av manuelt. Logg A var defekt ved avslutning og vi har derfor ikke digitale data fra denne, bare de manuelt avleste målingene.



Poser med hestemøkk i samme høydenivå, tre gjentak (t.v.), poser tildekket med synlige merkelapper etter opplegging av kompostranken (midten) og kompostranken med poser ved slutten av forsøket (t.h.).

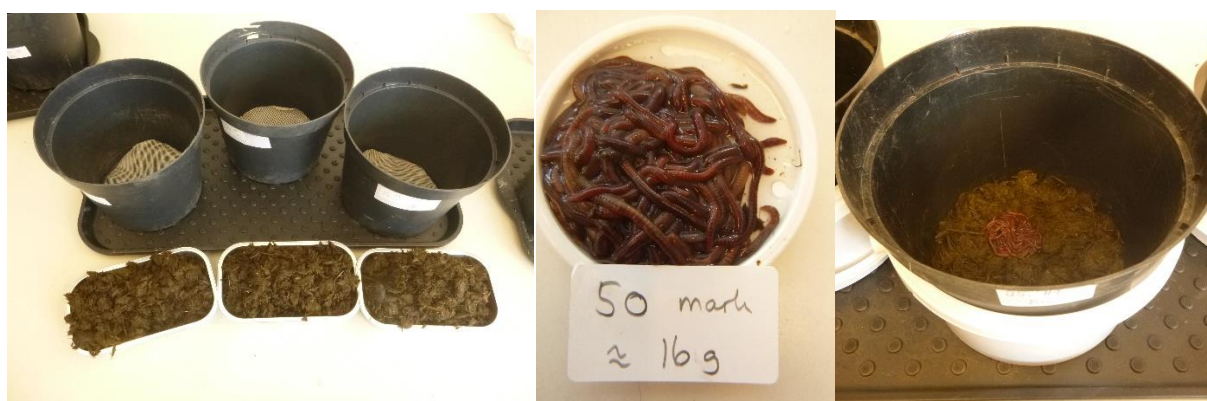
Opplegging av kompostranke

Ranken ble lagt opp 7. juni med en blanding av 7 traktorskuffer (à 750 l) hestemøkk og 3 traktorskuffer plen gras. Hestemøkk med et minimum av treflis, ble samlet opp fra to dølahester på før- og etterjuls vinteren 2016/-17. Hestemøkk og gras ble blandet på en betongplass med pallegaffel på fronlesser og videre med greip ved opplegging. Kompostranken var ca 1,5 m x 3 m og 130 cm høy og lagt på en plass med skygge om morgenen og sol om ettermiddagen. Ranken ble lagt på en Toptex fiberduk og dekket med samme type duk. Duken ble bare tatt av ved uttak av prøver. Det ble gravd ut en grop langsetter ranken, ca 60 cm bred og ca 60 cm fra bakken. Posene med prøvene ble lagt i en firkant for hvert gjentak med en temperaturlogg i midten. Det var ca 10 cm med kompost mellom posene, slik at de ikke skulle «smitte» hverandre. Merkelappen med kort snor ble lagt slik at den ikke berørte nettingposene for å sikre mest mulig kontakt med kompostmaterialet rundt. Merkelappene med lang snor ble lagt på utsiden av komposten for enkelt å

finne prøveposene og på festesnorene på posene ble det laget en løs løkkeknute for å gjøre det enklere å ta ut prøver. Det ble lagt stein på temperaturfølerne for å holde dem på plass. Kompost ble lagt oppå og rundt posene med greip og med hendene. Dette forsøket varte fra 7.6 - 7.8.2017.

Potter med meitemark – klargjøring og oppfølging

Basert på forundersøkelsen, ble pottene klargjort med 50 meitemark i 270 g fersk hestemøkk i 5 liters blomsterpotter, med netting i bunnen, stående i en liten bøtte. Meningen var å ha 500 g hestemøkk i hver potte, men hestene gav ikke sammen mengde møkk etter medisinerings som da vi sjekket dem tidligere, derfor ble mengden det vi hadde tilgjengelig, nemlig 270 g i hver potte. Temperatur i rommet var 20-25°C.



Fem liters blomsterpotter med ekstra netting i bunnen ble fylt med hestemøkk (t.v.) og det ble hatt 50 kompostmeitemark i hver potte (midten). Etterpå ble pottene satt i hver sin bøtte (hvit) for å fange opp eventuelt rømte meitemark (t.h.).

Meitemarkartene *Eisenia fetida* og *E. andrei*, vanlige arter kompostmeitemark, er brukt i andre forsøk med kompostering (Munroe, 2004, Edwards m fl. 2011). Artene finnes i Norge og ble derfor valgt til dette forsøket. Artene er veldig like hverandre og ikke mulig å skille under lupe, derfor vet vi ikke hvor mange det var av hver art. Det var like mange voksne og unge meitemarker i hver potte. Passet fuktigheten (ca 70 %) ved å dusje med vann og temperatur var 20-25°C. Det ble brukt meitemark fra husholdningskompost (blanding av hageavfall og matavfall). De levde i rein hestemøkk i ca 12 uker før forsøket ble satt i gang.

Forsøket gikk fra 7.6 -17.7.2017. Det var fire behandlinger med tre gjentak. Behandlingene var ren hestemøkk (fra Hest 1 før den fikk medisin), Hest 1 sin møkk fra dagen etter medisinerings (Hest 1 dag 1), Hest 1 sin møkk fra tredje dagen (H1 dag 3) og Hest 2 sin møkk fra dag 2 etter medisinerings (H2dag2). Da meitemarkene døde i pottene med hestemøkk uten medisinrester, ble det den 13.juni laget tre nye potter med ny hestemøkk uten medisinrester fra to andre hester. Disse ble tilsatt 15 kompostmeitemark til 270 g møkk. Prøvene sto sammen med de andre pottene til forsøket ble avsluttet, for å se om meitemarkene overlevde. Fra disse pottene ble det ikke tatt prøver til analyser.

Uavhengig av hvordan det gikk med meitemarkene, ble pottene stående. De ble vannet, dusjet med en dusjeflaske, og rusket litt i overflaten ca hver 3 dag. Det var generelt vanskelig å holde jevn og stabil fuktighet i pottene, hovedsakelig fordi det var for lite volum og for stor overflate. Et lokk ble lagt lett over for å minske fukttapet. En pinsett ble brukt for pottene med samme «type» møkk.

Resultat og diskusjon

Utskilling av medisinrester i fast hestegjødsel

Resultatene fra de medisinerte hestene og innholdet av medisinrester er vist i Tabell 3. Fra disse kan de konkluderes med at det var godt samsvar mellom hvilke stoffer hestene fikk og hvilke vi fant igjen i analyseprøvene av hestemøkk. Det betyr at den utviklede analysemetoden virket, og at det kan analyseres for flere virkestoffer i samme hestemøkkprøve. I prøvene fra de samme to hestene, men før de fikk medisiner (H1D0 og H2D0) ble det imidlertid funnet lave mengder av pyrantel og trimetoprim (se Tabell 3). Hva dette kan skyldes er uvisst.

Tabell 3. Innhold av ulike medisinrester i hestemøkk fra to behandlede hester, Hest 1 (H1) og hest 2 (H2). Dag 0 er verdier før de fikk medisin, de andre er fra gitte dager etter medisinerings (D1-D5). Begge hestene fikk antibiotika med virkestoffene trimetoprim og sulfadiazin. I tillegg fikk H1 parasittmiddel med virkestoffet fenbendazol og Hest 2 parasittmiddel med virkestoffet pyrantelmonat (målt som pyrantel). Verdiene er gitt i mikrogram per gram tørr hestemøkk.

	Trimetoprim ug/g	Sulfadiazin ug/g	Fenbendazol ug/g	Pyrantel ug/g	
Hest 1					antall gjentak
H1D0	0,00	0,00	0,00	0,01	n= 1
H1D1	2,39	7,17	15,21	0,13	n=3
H1D3	1,87	0,99	0,25	1,18	n=3
H1D5	0,34	0,11	0,06	1,11	n=1
Hest 2					
H2D0	0,08	0,00	0,00	0,05	n=1
H2D2	1,99	2,93	0,00	47,76	n=3
H2D5	0,24	0,08	0,00	1,61	n=1

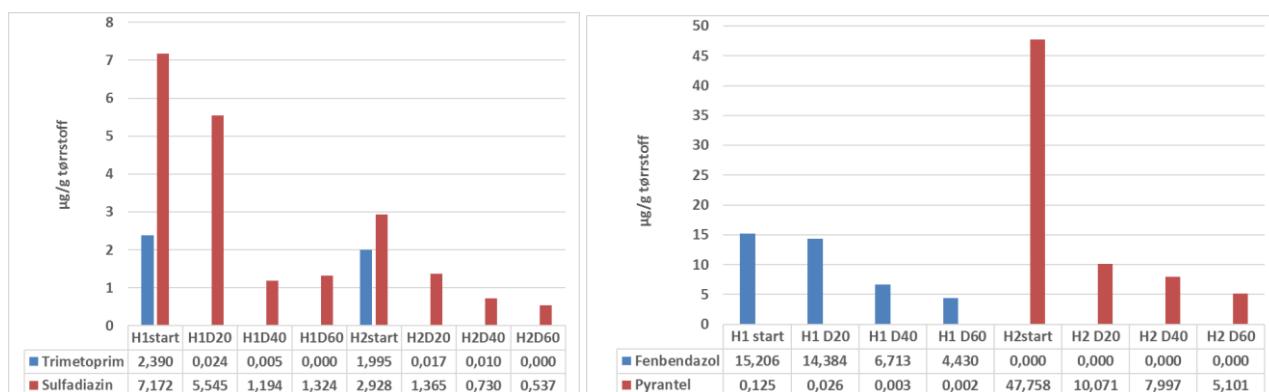
Innholdet av virkestoffene avtok raskt i hestemøkken i løpet av de tre første dagene etter medisinerings (Tabell 3). Nivåene som måles i analysene stemmer godt overens med den metabolske nedbrytningstida som oppgis for stoffene sulfadiazin og fenbendazol for hest (Tabell 1). For trimetoprim finner vi høyere verdier enn forventet de første dagene, men tilbakeholdelsesfristen for slakt virker rimelig sikker også som indikasjon på at stoffet ikke finnes igjen i møkken (Tabell 1).

Virkestoffet pyrantelmonat absorberes i liten grad gjennom tarmen i hestekroppen og tilbakeholdelsestid for slakt er derfor 0 døgn (Tabell 1). Det meste av middelet skiller ut i møkk, og her finner vi høye verdier i møkk både på dag 2 og dag 5. Det at analysen finner pyrantel hos både hos hest 1 og hest 2 på dag 0, og at nivået stiger fra dag 1 til 3 på hest 1 stemmer dårlig med det vi forventet, siden ingen av hestene fikk dette middelet før forsøket startet, hest 1 ikke fikk pyrantel og hestene gikk adskilt fra hverandre i forsøket.

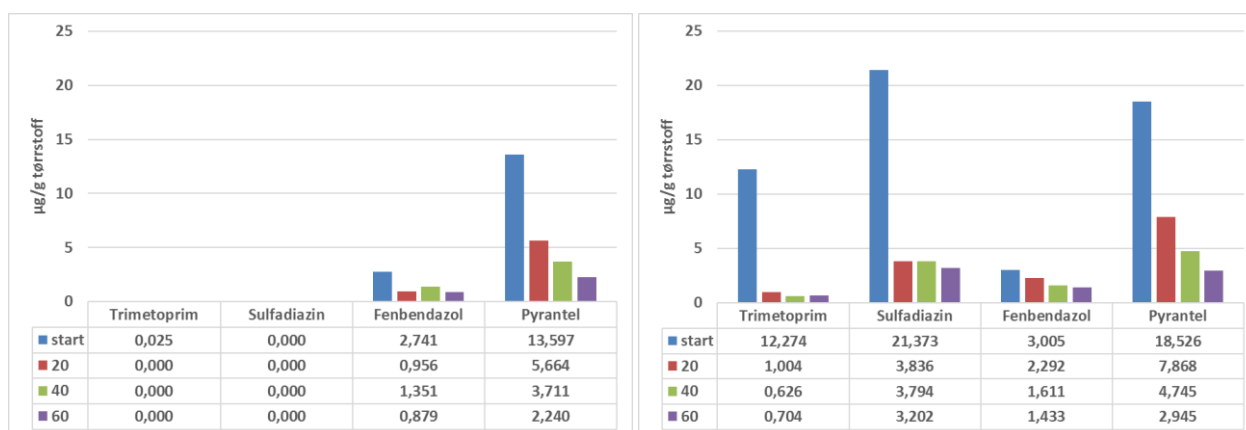
Kompostranke

Resultatene fra komposteringsforsøket er vist i Figur 1 og Figur 2. Fra disse kan vi se at det er godt samsvar mellom hvilke stoffer hestene fikk og hvilke vi fant igjen i analyseprøvene av hestemøkken som ble kompostert. I komposten reduseres nivåene for flere av stoffene merkbart fra start til analyse på dag 20. Deretter skjer en utflating og saktere reduksjon som holder seg jevnt frem til dag 60 (Figure1 og Figur 2). Bare for det virksomme stoffet trimetoprim, skjer det en rask nedbryting til dag 20 og etter 60 dager i komposten finnes det ikke målbare verdier (Figur 1). I prøvene der gjødsel ble tilsatt medisin, finnes det sporbare rester av trimetoprim også etter 60 dager (Figur 2). De høyeste konsentrasjonene av medisinrester

som gjenfinnes etter 60 dager, er for stoffet pyrantel, fulgt av fenbendazol, virkestoffene i parasittmidlene (Figur 1 og Figur 2).



Figur 1. Medisinrester i hestemøkk kompostert i ranke i 60 dager. Utgangspunktet var hestemøkk fra medicinerte hester. Figuren til venstre viser gjennomsnittlig restnivå av antibiotika og figuren til høyre viser gjennomsnittlig restnivå av parasittmidler. Verdiene er gitt i mikrogram per gram tørrstoff.



Figur 2. Medisinrester i hestemøkk kompostert i ranke i 60 dager. Utgangspunktet var medisiner tilsatt direkte i hestemøkk. Figuren til venstre viser gjennomsnittlige nivåer i prøver som ble tilsatt parasittmidler, til høyre prøve som ble tilsatt både antibiotika og parasittmidler. Verdiene er i mikrogram per gram tørrstoff.

Nivåendringer over tid av medisinrester i fersk møkk og i kompostranken

Fra hestene reduseres konsentrasjonen av de utskilte, virksomme stoffer i fast gjødsel etter 5 dager til mellom 0,06 - 0,34 $\mu\text{g/g}$ TS for trimetoprim, sulfadiazin og fenbendazol (Tabell 4). For pyrantel er konsentrasjonen 1,61 etter 5 dager. I kompostranken skjer en langsommere reduksjon av medisinrester over tid (Tabell 4). Metabolismen i hestekroppen og i komposten kan i utgangspunktet ikke sammenliknes, men resultatene i vårt forsøk og analysemetoden kan brukes til å utvikle strategier for håndtering av møkk med medisinrester.

Tabell 4. Nivåendring av de virksomme stoffene trimetoprim, sulfadiazin, fenbendazol og pyrantel utskilt i møkk i løpet av 1-5 dager etter medisinering av hestene og nivåendring av de samme stoffene i gjødsel fra medisinerte hester og møkk tilsatt medisin etter 60 dager i kompostranken. Verdiene er gitt i mikrogram per gram tørrstoff ($\mu\text{g/g TS}$).

Virksomt stoff	Hest 1 1-5 dager	Kompost: gjødsel fra hest 1 1-60 dager	Hest 2 2-5 dager	Kompost: gjødsel fra medisinert hest 2 1-60 dager	Kompost: gjødsel tilsatt medisin 1-60 dager	Kompost: gjødsel tilsatt medisin 1-60 dager
Trimetoprim	2,39 → 0,34	2,39 → 0,00	1,99 → 0,24	1,99 → 0,00	12,27 → 0,70	-
Sulfadiazin	7,17 → 0,11	7,17 → 1,32	2,93 → 0,08	2,93 → 0,54	21,37 → 3,20	-
Fenbendasol	15,21 → 0,06	15,21 → 4,43	-	-	3,01 → 1,43	2,74 → 0,88
Pyrantel	0,13 → 1,11	0,13 → 0,00	47,76 → 1,61	47,76 → 5,10	18,53 → 2,95	13,60 → 2,24

Våre utprøvinger og analyser tyder på at møkk fra behandlede hester bør skilles fra annen møkk et gitt antall dager etter medisinbehandling, og at det må utarbeides håndteringsstrategier for denne møkken. Analysemetoden ser ut til å kunne brukes til å detektere så lave nivåer av medisinrester, at den bør kunne brukes til eventuelt å fastsette tilbakeholdsfrister for husdyrgjødsel fra medisinerte dyr. Det må flere utprøvinger til mht omdanningshastighet av medisinrester ved ulike komposteringsmetoder. For å kunne avgjøre om aerob kompostering kan være en aktuell metode for å redusere medisinrester i hestegjødsel trengs flere utprøvinger mht temperaturutvikling, vending av komposten, størrelsen på kompostranken, fuktighetsforhold og overlevelse av kompostmeitemark. Håndtering av urin er også viktig å ha med videre. Det trengs mer kunnskap om hvorvidt nivåene av medisinrester som man gjenfinner i gjødsel og kompost kan ha uheldige virkninger på miljøet, på bakterier og nematoder i kompost og jord, og om det kan medføre økt risiko for resistensutvikling mot ulike medisinere.

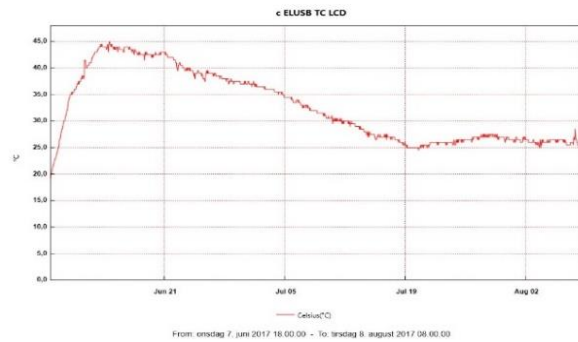
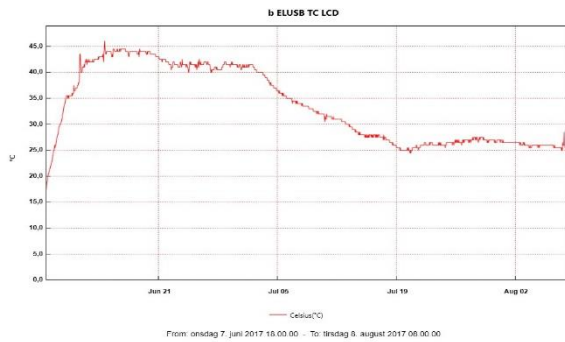
Temperaturutvikling i kompostranken

Ved oppstart var temperaturene henholdsvis 18, 19 og 18 °C i målepunktene. Manuell avlesninger av loggene i starten, viste at logg A oppnådde temperaturer som var høyere enn maxmålinger for loggene B og C. Sandberger termometer viste ved noen tilfeller høyere temperaturer enn loggmålingene.

Tabell 4. Manuelle avlesninger av temperaturer i rankekomposten fra loggene og Sandberger stavmåler på tilfeldig valgte dager.

Dato	Måleutstyr	A	B	C
9/6	Logg	38	29	29
11/6	Logg	51	43	41
13/6	Logg	46	42	44
	Sandberger	59	48	51
19/6	Logg	43	43	42
	Sandberger	43	48	45
27/6	Logg	39	40	38
	Sandberger	31	40	36
10/7	Logg	-	30	31
17/7	Logg	-	27	26
	Sandberger	24	27	26





Temperaturkurver i rankekomposten for logger B og logger C i hele perioden.

Temperaturnivå har i forsøk vist seg å virke inn på nedbrytningshastighet for medisiner. I et litteraturstudium utført av Youngquist mfl. (2016), omhandles skjebnen til antibiotika og antibiotikaresistens der temperatur er en av faktorene som belyses. Eksempelvis ble 8% og 98 % av stoffet chlortetracycline nedbrutt ved temperaturer på henholdsvis 38 og 55 °C i en biogassreaktor. Det påpekes imidlertid at problematikken er kompleks og at det er få stoffer som er testet og enda færre nedbrytningsprodukter.

Potter med meitemark

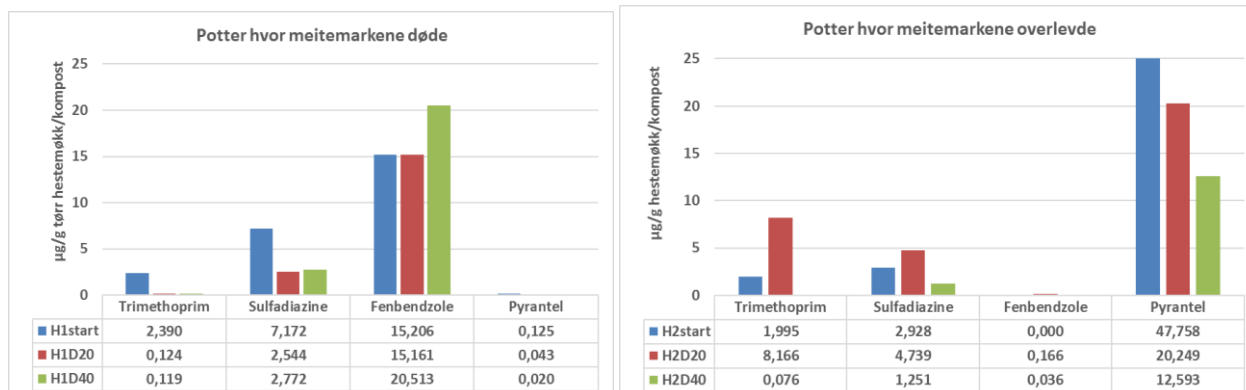
Meitemarkene tålte ikke møkken fra hest 1. Alle meitemarkene døde i løpet av ett døgn i medisinerert hestemøkk fra hest 1 og dag 1 (H1D1). Vi satte til 10 nye meitemark i hver potte, som alle døde til neste dag. Alle meitemarkene døde imidlertid også dagen etter i H1D3 pottene, som inneholdt møkk fra samme hest fra dag tre etter medisinerer. Videre ble meitemarkene i pottene med H1D0, ren hestemøkk fra Hest 1, også slappere etter tre dager og alle var døde på dag 5. Meitemarkene i pottene med medisinerert hestemøkk fra hest 2 og dag 2 (H2D2), overlevde til 20.juni i én potte og til 23. juni i de to andre, dvs. i 13-16 døgn. Disse så vanlige og spreke ut helt til slutt.



Døde, og døende meitemark i medisinerert hest (H1) sin møkk (t.v.) og friske og raske meitemark i medisinerert hest (H2) sin møkk(t.h.).

Det ble en veldig sterk, vond lukt i de pottene der meitemarkene døde. Vi valgte å fortsette å ha disse pottene med videre uten meitemark. Rørte i hestemøkka i pottene med en pinner og lot de stå videre med passe fuktighet. Lukta forsvant igjen etter hvert. Siden alle meitemarkene tilknyttet Hest 1 sin møkk døde,

også de fra den rene møkka, satte vi opp tre ekstra pottar med ren hestemøkk fra to andre hester. De stod under samme forhold som resten fra 13.juni til 17.juli og var i fin, frisk form også helt i slutten av forsøket.



Restnivå av ulike medisiner i hestemøkk kompostert med meitemark i pottforsøk i 40 dager.

Utgangspunktet var møkk fra medisinererte hester. Resultatene i venstre diagram er fra Hest 1 som fikk begge antibiotikaene og ett parasittmiddel (fenbendazol). Til høyre, diagram for hest 2 som fikk begge antibiotikaene og det andre parasittmiddelet (pyrantel). Nivåene oppgis i mikrogram per gram tørrstoff.

Det ble analysert for rester av medisiner på dag 20 og dag 40 etter kompoststart. Det ble funnet rester av antibiotikamidlene i varierende mengder utover i perioden, ikke alltid mindre slik vi hadde forventet. For parasittmiddelet fenbendazol var det høyere verdi etter 40 dager enn ved start. For pyrantel var det en nedgang i innholdet fra dag 20 til dag 40, og var enda høyt etter 40 dager.

At meitemarkene døde raskt i møkka fra den ene medisinererte hesten (H1D1), kan ikke brukes til å konkludere så mye siden meitemarkene også døde i ren møkk fra samme hest. Det at de døde i nulledet var uventet. Meitemarkene spiste seg gjennom en god del møkk der de overlevde, i H2D2 pottene. Her var det litt uventet at det var høyere verdier av antibiotika etter 20 dager enn ved start, har ingen god forklaring på det. Denne hesten fikk ikke fenbendazol og det ble funnet ørsmå mengder av dette likevel. Mengden pyrantel avtok lite over tid i disse prøvene, men var enda høyt etter 40 dager.

Det kan ikke konkluderes om kompostering ved hjelp av meitemark har noen effekt på de gitte stoffene i hestemøkka fordi meitemarkene døde i halve oppsettet vårt. Et nytt forsøk bør gjennomføres på dette. Det ble for lite materiale som kunne brukes og derfor for stor overflate, så det var lett at det tørket litt ut på overflaten. Det bør minst være 500 g møkk i hver potte ved et nytt forsøk og minst 50 meitemark, gjerne juvenile for de trenger mer mat. Ta bort nettet i bunnen av pottene, de krøp under uansett, men ha gjerne en bønne «utenpå» potten, for å se om de rømmer eller ikke.

Markedsundersøkelse om jord og gjødsel

Det ble gjennomført en spørreundersøkelse om jord og gjødselprodukter blant 100 kunder ved et Hagesenter i Møre og Romsdal våren 2017. Hensikten med undersøkelsen var å kartlegge hva kunder av jordprodukter stiller som krav til jord, hva slags kunnskap de har om ulike jordprodukter og om kjøpe- og betalingsvilligheten for eventuelle nye jordprodukter basert på lokal hestegjødsel.

Metode

Spørsmål ble utformet relatert til bruk, kjøp, pris og ønsker om jordegenskaper til jordprodukter. Spørreundersøkelsen ble testet på ansatte ved NORSØK og NIBIO TINGVOLL som ga kommentarer og forslag til endringer. Omarbeidet spørreskjema ble brukt i undersøkelsen. På en messedag der det var antatt at mye folk ville komme til hagesenteret, ble det laget til en stand for prat om jord og utdeling av spørreskjemaet. Alle som fylte inn skjema fikk premie. Ansatte ved hagesenteret bidro ellers aktivt med informasjon og utdeling av spørreskjemaet.



Stand om jord på hagesenter og kunder som svarte på spørreskjemaene som vi hadde laget til.

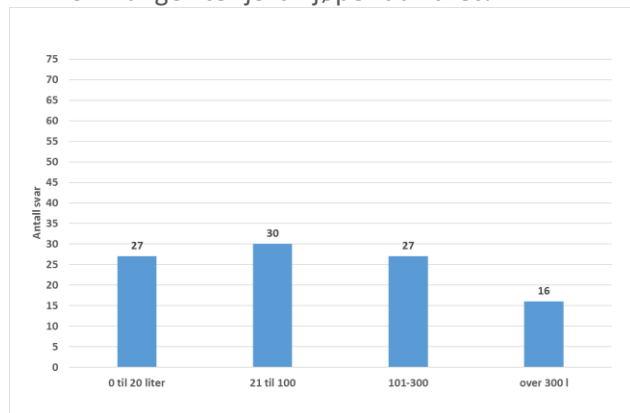
Resultater og diskusjon

Undersøkelsen viser at 30 % av de spurte kjøper mellom 20 og 100 liter jord og 27 % kjøper mellom 100 – 300 liter (se figurer under). 16% kjøper mer enn 300 liter. Jorden brukes hovedsakelig i bed med blomster og grønnsaker. Flere svarer at de foretrekker husdyrgjødsel fremfor kunstgjødsel som næringstilførsel i produktet. Torvproduktet tilsatt kunstgjødsel har fått lavest score av valgalternativene mens torvprodukt tilsatt husdyrgjødsel har fått høyest score. Fra dette kan det sluttet at de spurte har en bevisst holdning til bruk/ikke bruk av kunstgjødsel, muligens som resultat av et allment fokus på *miljøvennlighet*. Det er tenkelig at husdyrgjødsel i denne sammenhengen fremstår som mer *miljøvennlig* (naturlig) enn kunstgjødsel.

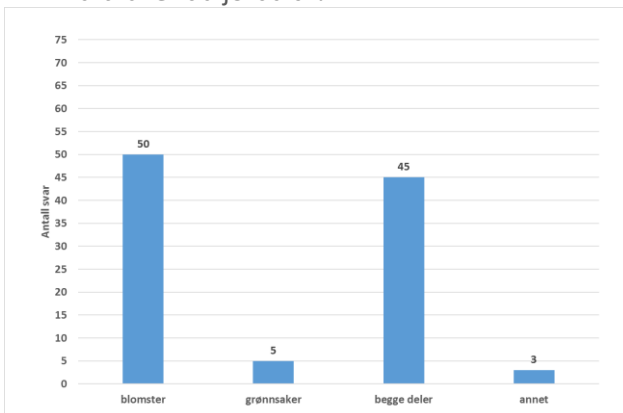
Angående torvbaserte kontra torvfrie produkter, kan det virke som de spurte har et mindre bevisst forhold til bruken (spørsmål 3). Dette kom også frem i uformelle samtaler med kunder på hagesenteret. Dette var noe overraskende siden de uheldige virkningene ved bruk av torv har hatt mye medieoppmerksomhet. Valgalternativet med produkt basert på hestegjødsel fikk ganske lik score som torv med kunstgjødsel. At responsen på dette alternativet ligger såpass under både torv-husdyrgjødsel og produktet basert på hageavfall, kan forklares med at dette produktet presenteres som noe nytt eller at hestegjødsel tradisjonelt sett er kjent for å ha dårlig næringsverdi p.g.a høy innblanding av sagflis/sagmugg. På den annen side har 60% av de spurte svart positivt på at lokalprodusert betyr noe og 70 % har svart at de ville kjøpt et lokalprodusert produkt av kompostert hestegjødsel dersom det var tilgjengelig. Angående pris svarte 46 % at de ville kjøpt produktet dersom det kostet 20% mer enn en torvbasert plantejord, mens bare 4% ville kjøpt produktet dersom det koster 50% mer. Selv om undersøkelsen bare baserer seg på 100 svar, tenderer svarer

i retning av interesse for lokalt produsert jordprodukt og at ca 50 % av de spurte er villige til å betale 20% merpris.

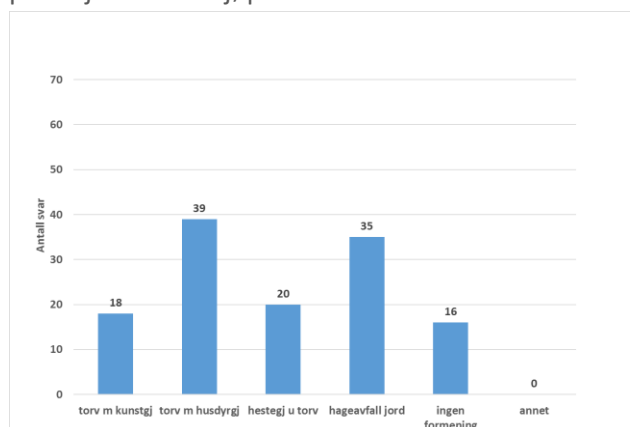
1. Hvor mange liter jord kjøper du i året?



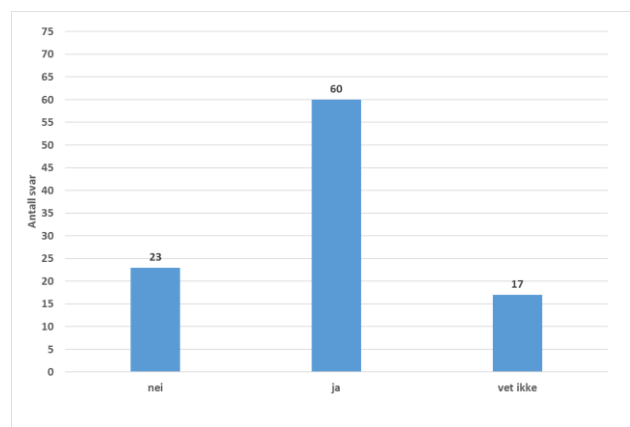
2. Hva bruker du jorda til?



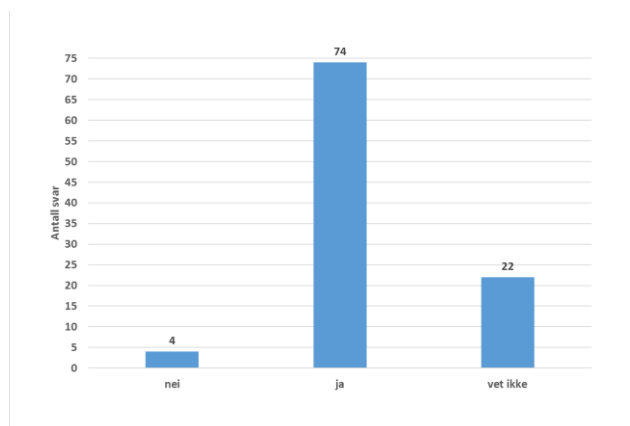
3. Plantejord som selges består mest av torv (tatt fra myrer). Hvis du har valget – hvilken type plantejord vil du kjøpe?



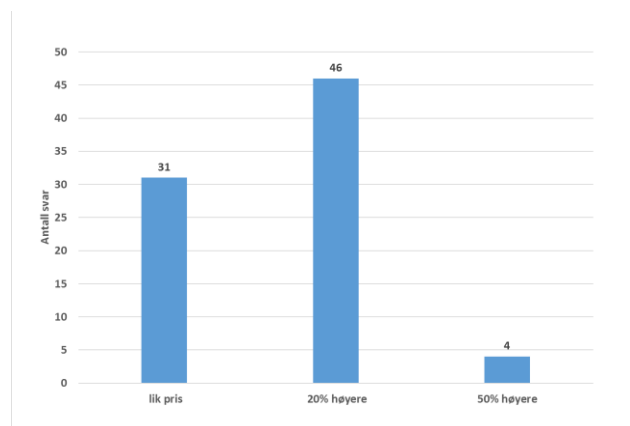
4. Betyr det noe for deg at plantejorda er lokalprodusert?



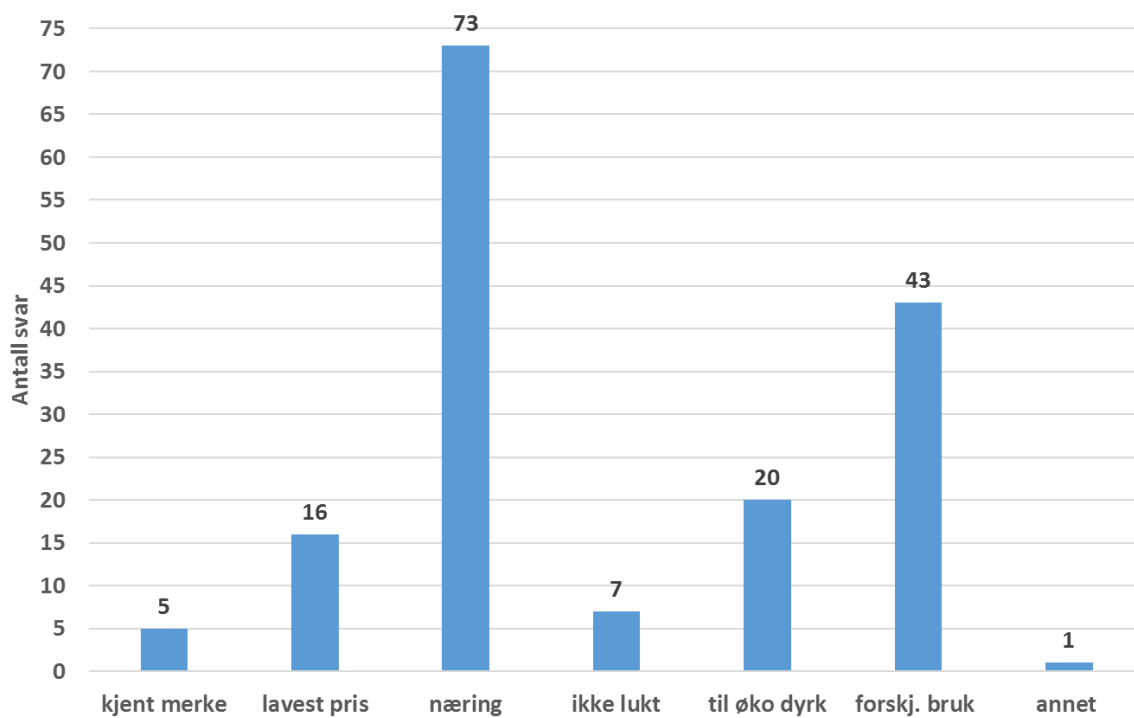
5. Ville du kjøpt plantejord av kompostert hestegjødsel fra Nordmøre fremfor en torvbasert plantejord dersom det var tilgjengelig?



Dersom ja:



6. Hva er viktigst når du kjøper plantejord og gjødsel? Velg to alternativer.



Resultat fra spørreundersøkelsen der 100 hagesenterkunder deltok.

Problemstillinger for videre arbeid

Prosjektgruppen oppsummerte følgende punkter som viktige for videre arbeid:

- Analysemetoden som vi har brukt, kan både videreutvikles til å kunne analysere for andre virkestoffer, andre typer gjødsel og urin, og bli mer nøyaktig mht målinger av noen stoffer, eksempelvis pyrantel.
- Undersøke nærmere og i storskalaforsøk nedbrytningstiden for medisiner i ulike biologiske håndteringsmetoder. For å kunne avgjøre om aerob kompostering kan være en aktuell metode for å redusere medisinrester i hestegjødsel trengs flere utprøvinger mht temperaturutvikling, vending av komposten, størrelsen på kompostranken, fuktighetsforhold og overlevelse av kompostmeitemark.
- Kompostering ved hjelp av meitemark kan også optimaliseres og undersøkes i større skala, da gjerne sammen med et firma som produserer kompost ved hjelp av meitemark.
- Hvordan medisinrester i gjødsel brytes ned i anaerob fermentering i biogassreaktorer bør undersøkes.
- Undersøke og analyse for medisinrester og nedbrytningsprodukter (metabolitter) i norsk husdyrgjødsel. Chung et al. (2017) skriver at metabolitter kan være mindre, like eller mer skadelig enn utgangsproduktene.
- Utvikle retningslinjer for håndtering av fast gjødsel og urin fra medisinerte hester. Et mål er å unngå tilførsel av gjødsel som inneholder medisinrester i uforandret form eller metabolitter av disse til dyrkingsjord.
- Utvikle kommersielle produkter basert på lokal hestegjødsel, fri for medisinrester, til jord- og hagebruk.

Referanser

- Boxall, A.B A.**, Kolpin, D.W. & B. Halling-Sørensen & J. Tolls, **2003**. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environmental science & technology*, August 1, 286-294.
- Chung, H. S.**, Lee, Y.J. Rahman, Md. M., El-Aty, A.M.A., Lee, H. S., Kabir, Md. H., Kim, S.W., Park, B.J., Kim, J.E., Hacımüftüoğlu, F., Nahar, N., Shin, H.C. & J.H. Shim, **2017**. Uptake of the veterinary antibiotics chlortetracycline, enrofloxacin, and sulphathiazole from soil by radish, *Science of the total Environment*, Volumes 605-606, p.322-331
- De Boer, A.** **2017**. Veterinær antibiotika i jord. Studentoppgave ved Høgskolen i Hedmark.
- Halling Sørensen, B.**, Nielsen, S.N. & J. Jensen, **2002**. Environmental Assessment of Veterinary Products in Denmark. Environmental Projekt 659.
- Hansen, M.**, Björklund, E. Krogh, K.A., Brandt, A. & B. Halling-Sørensen, **2012**. Biotic transformation of anticoccidials in soil using lab-scale bio-reaktor as precursor-tool. *Chemosphere* 86, 212-215.
- Heuer, H.**, Schmitt, H. & K. Smalla, **2011**. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology* 14, 236-243.
- Edwards, C.A.**, Arancon, N.Q. & R. Sherman, **2011**. Vermiculture Technology. Earthworms, organic Wastes and Environmental Management. 600 sider, CRC Press, New York.
- Kim, K.-R.**, Owens, G., Ok, Y.S., Park, W.-K., Lee, D.B. & S.-I. Kwon. **2011**. Decline in extractable antibiotics in manure-based composts during composting. *Waste management* 23 August 2011
- Kumar, K.**, Gupta, S. C., Baidoo, S. K., Chander, Y. & C.J. Rosen, **2005**. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality*,34, 6, 2082-2085.
- Liu F.**, Ying, G.G., Tao, R.Z., Zhao, J. L., Yang, J. F. & L.F. Zhao, **2009**. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities, *Environmental Pollution*, p. 1636-1642
- Malgeryd, J.** **2013**. Hästgödsel - en naturlig resurs. *Jordbruksinformation* 5 -13, Jordbruksverket.
- Massé, D. I., Noori M., Cata Saady & Y. Gilbert. 2014. Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: An overview. *Animals* 2014, 4, 146-163.
- Method 1694, 2007**. Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology Engineering and Analysis Division (4303T), 1200 Pennsylvania Avenue, NW, Washington, DC 20460, EPA-821-R-08-002, 72 ss.
- Munroe, G.** **2004**. Manual of On-Farm Vermicomposting and Vermiculture. Organic Agric. Centre of Canada.
- Serikstad, G.L.**, K. Mckinnon & T. Eggen, **2012**. Uønskete stoffer i husdyrgjødsel. Konvensjonell husdyrgjødsel brukt i økologisk drift – er det problematisk? *Bioforsk Rapport* 7, 28, 56 sider.
- Sarmah, A.K.**, M.T. Meyer & A.B.A. Boxall, **2006**. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere* 65, 725-759.
- Svahn, O. & E. Björklund, 2016**. Increased electrospray ionization intensities and expanded chromatographic possibilities for emerging contaminants using mobile phases of different pH. *Journal of Chromatography B*, 1033, 1–10.
- Youngquist, C.P.**, Mitchell S.M. & C.G. Cogger, **2016**. Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistance during Digestion and Composting: A Review, *Journal of Environmental Quality*, 45:537-545.



www.norsok.no



Norsk senter for økologisk landbruk, NORSØK er ei privat, sjølvstendig stifting. Stiftinga er eit nasjonalt senter for tverrfaglig forskning og kunnskapsformidling for å utvikle økologisk landbruk.

NORSØK skal bidra med kunnskap for eit meir berekraftig landbruk og samfunn. Fagområda er økologisk landbruk og matproduksjon, miljø og fornybar energi.

Norsk senter for økologisk landbruk / Gunnarsveg 6 / NO-6630 TINGVOLL / Telefon: +47 930 09 884 / E-post: post@norsok.no