



# MILJØKONSEKVENSER AF GØDSKNING MED FORSURET GYLLE

Teknisk rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

nr. 336

2025



AARHUS  
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI



# MILJØKONSEKVENSER AF GØDSKNING MED FORSURET GYLLE

---

Teknisk rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

nr. 336

2025

Dominik Zak<sup>1</sup>  
Niels Gudmand Christiansen<sup>2</sup>  
Anne Winding<sup>2</sup>  
Rumakanta Sapkota<sup>2</sup>  
Mette Thorsen<sup>1</sup>  
Marianne Bruus<sup>1</sup>  
Rasmus Jes Petersen<sup>1</sup>  
Paul Henning Krogh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aarhus Universitet, Institut for Ecoscience

<sup>2</sup>Aarhus Universitet, Institut for Miljøvidenskab



AARHUS  
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

# Datablad

Serietitel og nummer:	Teknisk rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 336
Kategori:	Rådgivningsrapporter
Titel:	Miljøkonsekvenser af gødskning med forsuret gylle
Forfattere:	Dominik Zak <sup>1</sup> Niels Gudmand Christiansen <sup>2</sup> Anne Winding <sup>2</sup> Rumakanta Sapkota <sup>2</sup> Mette Thorsen <sup>1</sup> Marianne Bruus <sup>1</sup> Rasmus Jes Petersen <sup>1</sup> Paul Henning Krogh <sup>1</sup>
Institutioner:	<sup>1</sup> Aarhus Universitet, Institut for Ecoscience <sup>2</sup> Aarhus Universitet, Institut for Miljøvidenskab
Udgiver:	Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi ©
URL:	<a href="https://dce.au.dk">https://dce.au.dk</a>
Udgivelsesår:	Februar 2025
Redaktion afsluttet:	Februar 2025
Faglig kommentering:	Kap. 5: seniorforsker Hans Estrup Andersen. Kap. 6 og 7.2.2, 7.2.3, 7.3.3, 7.3.4: seniorforsker Niels Bohse Henriksen, ENVS, AU. Kap. 4 og kap. 7: professor Martin Holmstrup, ECOS, AU.
Kvalitetssikring, DCE:	Signe Jung-Madsen
Sproglig kvalitetssikring:	Anne Mette Poulsen
Ekstern kommentering:	Ingen ekstern kommentering
Finansiel støtte:	Ingen ekstern finansiering
Bedes citeret:	Zak, D., Christiansen, N.G., Winding, A., Sapkota, R., Thorsen, M., Bruus, M., Petersen, R.J. & P.H. Krogh. 2025. Miljøkonsekvenser af gødskning med forsuret gylle. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 42 s. - Teknisk rapport nr. 336
	Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse
Sammenfatning:	Projektet undersøgte effekten af forsuret kvæggylle på udvaskning af sulfat, fosfat og jordbundssundhed i kløver-græsmarker. Øget svovlsyreindhold førte til øget udvaskning af sulfat, mens effekterne på fosfat og tungmetaller var minimale. Forsuret gylle påvirkede ikke væsentligt mikroarthropoder, men ændrede jordens enzymaktivitet og mikroorganismer, især ved høj forsuring. Regnorme blev ikke påvirket efter to påføringer, men viste negative effekter efter fire. Langtidseffekter af forsuring er ikke vurderet, men kortsigtede resultater indikerer behov for yderligere undersøgelser.
Emneord:	Daisy model, ekstracellulær enzymaktivitet, fosfor udvaskning, grøn omstilling, jordbundssundhed, kvæggylle, sulfat
Foto forside:	Dronefoto af Paul Henning Krogh
ISBN:	978-87-7156-939-1
ISSN (elektronisk):	2244-999X
Sideantal:	42
Internetversion:	<a href="#">TR336.pdf</a>

# Indhold

<b>Forord</b>	<b>5</b>
<b>1 Indledning</b>	<b>6</b>
<b>2 Sammenfatning</b>	<b>8</b>
<b>3 Summary</b>	<b>9</b>
<b>4 Forsøgsareal og eksperimentelt design (AP1)</b>	<b>10</b>
<b>5 Risikovurdering for udvaskning af sulfat og mobilisering af fosfor og tungmetaller (AP2)</b>	<b>12</b>
5.1 Formål	12
5.2 Metode	12
5.3 Målinger af $\text{SO}_4^{2-}$ og $\text{PO}_4^{3-}$ -P i jorden	12
5.4 Beregning af perkolation	15
5.5 Beregning af ikke-reaktiv stoftransport	19
5.6 Opsummering af resultater fra AP2	22
<b>6 Rumlig udbredelse af effekter i jord-gyllemiljøer (AP3)</b>	<b>23</b>
6.1 Formål	23
6.2 Metoder	23
6.3 Resultater	25
<b>7 Effekter af forsuret gylle på mikroledyr, regnorme og mikrobiomet (AP4)</b>	<b>30</b>
7.1 Formål	30
7.2 Metoder	30
7.3 Resultater	32
<b>8 Referencer</b>	<b>40</b>



## Forord

I forbindelse med den politiske aftale "Aftale om grøn omstilling af dansk landbrug" i 2021 besluttede forligskredsen at afsætte midler til at igangsætte en række udviklingstiltag vedr. gyllehåndtering. Formålet var bl.a. at øge vidensniveauet inden for gylle- og gødningshåndtering og gøre det muligt på sigt at indregne reduktionseffekter i klimafremskrivningen/de nationale emissionsopgørelser. Det udmøntede sig i en række forsknings- og udviklingsprojekter. Nærværende rapport er en afrapportering af forskningsprojektet "Miljøeffekter af forsuret gylle".

I forbindelse med projekterne nedsatte det daværende Miljøministerie en følgegruppe bestående af medarbejdere fra Miljøministeriet og Aarhus Universitet med det formål at sikre projekternes fremdrift. Der har i projektperioden været afholdt møder i følgegruppen, hvor status for projekterne er blevet gennemgået.

# 1 Indledning

Tidligere forskning har vist, at forsuring af gylle i lagringsperioden kan reducere metan- og lattergasemissioner markant, hvis det udføres tidligt i lagringen. Dette kan bidrage væsentligt til at mindske drivhusgasudledningen fra husdyrgødningskæden (Andersen et al. 2021). På den anden side er der indledende indikationer på potentielle miljøeffekter ved anvendelse af forsuret gylle på dyrkningsjord (Jensen et al., 2018). Laboratorieforsøg udført af AU har ikke fundet effekter af forsuret gylle på lattergasemission (Andersen et al. 2024). Forsuring, som typisk foretages med svovlsyre, ændrer gyllens kemiske og biologiske sammensætning, hvilket kan påvirke dens effekt i jordbundsmiljøet samt føre til udvaskning af fosfor og svovl. Det er velkendt, at forsuring af gylle øger mobiliteten af fosfor, hvilket kan medføre en øget risiko for fosfortab i jorden. Desuden tilføres der langt mere svovl til jorden, end afgrøderne kan udnytte, hvilket øger risikoen for sulfatudvaskning. Hvis sulfat reduceres i jorden på grund af mikrobiel desulfurikation, kan det binde jern som jernsulfid, hvilket mobiliserer fosfat, der ellers ville være bundet til jernet. Udvasningen af fosfat har en negativ indvirkning på tilstanden i indlands- og kystvande (Kronvang et al. 2005)

Disse processer er blevet grundigt undersøgt i vådområder (Zak et al. 2009, 2021), hvor de hydrologiske forhold, lang opholdstid og højt organisk stofindhold fremmer sulfatreduktion. Der er dog et betydeligt videnshul, når det gælder de kvantitative effekter af disse processer i mineralske landbrugsjorder og deres afhængighed af jordens fysiske og kemiske egenskaber. Denne viden er nødvendig for at kunne forstå de langsigtede konsekvenser af forsuret gylle for både jordbundssundhed og miljøet.

De ovennævnte fysisk-kemiske ændringer som følge af gylleforsuringen kan forventes at påvirke jordbundsøkologien, dels pga. organismernes forskellige tolerance over for jordens struktur og pH (fx Sims & Gerard 1999, Muys & Granval 1997), dels pga. ændringer i tilgængeligheden af fx forskellige potentielt giftige metaller (fx Spurgeon et al. 2006). Den lave pH i forbindelse med forsuringen ændrer gyllens sammensætning og forekomst af mikroorganismer, ligesom det organiske materiale også ændrer sig (Fangueiro et al. 2015). Jordbundssundhed er et nøgleelement i jordens fertilitet og vigtig at inddrage i vurdering af sideeffekter af klimavirkemidler, herunder forsuring af gylle. For at vurdere sundheden anvendes parametre som jordbundens biodiversitet og mikrobielle processer, hvor forsuret kvæggylle sammenlignes med gylle uden syretilsætning. Kunstgødning anvendes også som reference.

En af de mest relevante metoder til udbringning af gylle i kløver-græsmarker er nedfældning i riller ("direct injection"), der kan være op til 3 cm dybe og 1,5-2 cm brede med en rækkeafstand på 25 cm. Ved forsuring udbringes gyllen dog med slanger direkte på jorden. Denne metode skaber en horisontal heterogenitet i jordens næringsfordeling, hvilket kan medføre større effekter i områder med højere koncentrationer af gylle end gennemsnittet. Derudover vil der være en vertikal fordeling af gyllen, som forventes at have størst biologisk effekt i overfladejorden. Den heterogene fordeling af gyllen kan derfor have større konsekvenser end de standardiserede antagelser om en homogen fordeling.



Formålet med dette projekt var at undersøge, hvordan gødskning med forsuret kvæggylle påvirker udvaskningen af sulfat og fosfat samt jordbundssundheden i kløver-græsmarker over en dyrkningssæson. Forsuringen skete med svovlsyre i koncentrationer under og op til de højeste koncentrationer, der ifølge gødningsbekendtgørelsen (BEK nr. 931 af 16/07/2024) må anvendes. For at kunne vurdere disse effekter blev der etableret et randomiseret blokforsøgsdesign på Askov Forsøgsstation i 2023. Følgende aspekter blev analyseret i detaljer:

- 1) Risikoen for udvaskning af sulfat og mobilisering af fosfor samt tungmetaller som aluminium, cadmium og zink. Dette blev vurderet på baggrund af normaldoseringer af syre samt realistiske worst-case scenarier.
- 2) Effekten af forsuret kvæggylle på jordens pH og kulstofindhold og den rumlige effekt på jordens aktive mikrobiom, som blev målt ved hjælp af ribosomalt RNA under laboratorieforhold.
- 3) Effekten af forsuret kvæggylle på jordens biota, herunder prokaryoter (bakterier og archaea), svampe, mikrolededyr, regnorme og ekstracellulær enzymaktivitet *in situ*.

Med disse undersøgelser er det projektets formål at kaste lys over de potentielle miljøeffekter af forsuret kvæggylle og bidrage til en bedre forståelse af, hvordan metoderne kan implementeres bæredygtigt i landbrugspraksis. Projektet har været organiseret i fire arbejdsplaner, og resultaterne fra disse gennemgås i kapitel 4 til 7.

## 2 Sammenfatning

Formålet med dette projekt var at undersøge, hvordan gødskning med forsuret kvæggylle med hhv. 2, 7 og 14 kg svovlsyre/ton kvæggylle påvirker udvaskningen af sulfat og fosfat samt jordbundssundheden i kløver-græsmarker over en dyrkningsæson. Niveauerne for tilsætning af svovlsyre følger retningslinjer fra gødningsbekendtgørelsen. Et randomiseret blokforsøgsdesign, der testede syv forskellige behandlinger, blev etableret på Askov Forsøgsstation, Aarhus Universitet, i 2023. De gennemførte målinger og beregninger indikerer, at øget anvendelse af svovlsyre med gylle kan føre til øget udvaskning af sulfat til grundvandet, mens effekterne på fosfat og tungmetaller ser ud til at være minimale.

Under laboratorieforhold påvirkede gylletilførsel den ekstracellulære enzymaktivitet markant i de øverste 5 mm, med en gradvis reduktion ned til 4,5 cm. Effekten var større i jorden uden for centrum med gylletilførsel, hvilket tyder på horisontal transport af gyllevæsken. Behandlingerne påvirkede diversiteten af aktive prokaryotsamfund (bakterier og archaea) i de øverste 5 mm, især ved 1,4 % forsuret gylle, mens den relative forekomst forblev uændret. Der var ingen effekt i jordlaget 5-15 mm. Diversiteten af aktive svampe blev også påvirket, især i de øverste lag og afhængigt af inkuberingstiden og med signifikante ændringer ved 1,4 % forsuret gylle.

I de udtagne jordprøver fra markforsøget med otte forskellige behandlinger blev der ikke fundet effekt på enzymaktiviteten, mens strukturen af svampe- og invertebratsamfundene blev påvirket af øget forsuring. Der blev observeret indikationer på effekter på mykorrhizasvampe, en følsom svampegruppe. Derimod blev der ikke fundet signifikante effekter af forsuring ved konventionel monitoring på det samlede antal af springhaler, mider og mikroarthropoder. Antallet og vægten af regnorme var upåvirket af forsuringen ved første prøvetagning (efter to tilførsler af forsuret gylle), mens der ved prøvetagningen i oktober, efter fire udbringninger af forsuret gylle, var negative effekter på regnormene. Desuden påvirkede jordens tekstur følsomheden af en regnormeart over for forsuring. Langsigtede effekter af forsuret gylle anvendt over flere år kan ikke vurderes ud fra resultaterne af dette projekt, men de fundne effekter ved kort tids anvendelse indikerer, at det kan være relevant at undersøge langtidseffekter.

### 3 Summary

The aim of this project was to investigate the effects of fertilization with acidified cattle manure (2, 7, and 14 kg sulfuric acid/t cow manure) on the leaching of sulfate and phosphate as well as soil health in clover-grass fields during a growth season. To assess these effects, a randomized block experimental design testing seven different treatments was established at Askov Research Station, Aarhus University, in 2023. The results indicate that increased application of manure acidified with sulfuric acid may lead to increased leaching of sulfate into groundwater while effects on phosphate and heavy metals seem minimal.

Under laboratory conditions, manure application significantly affected the extracellular enzyme activity in the top 5 mm, with a gradual reduction down to 4.5 cm. The effect was greater on the periphery of the soil, suggesting horizontal transport of the manure liquid. The treatments affected the diversity of active prokaryotic communities (bacteria and archaea) in the top 5 mm, particularly at 1.4% acidified manure, while the relative abundance remained unchanged. There was no effect in the 5-15 mm soil layer. The diversity of active fungi was also affected, especially in the top layers and depending on the incubation time, with significant changes at 1.4% acidified manure.

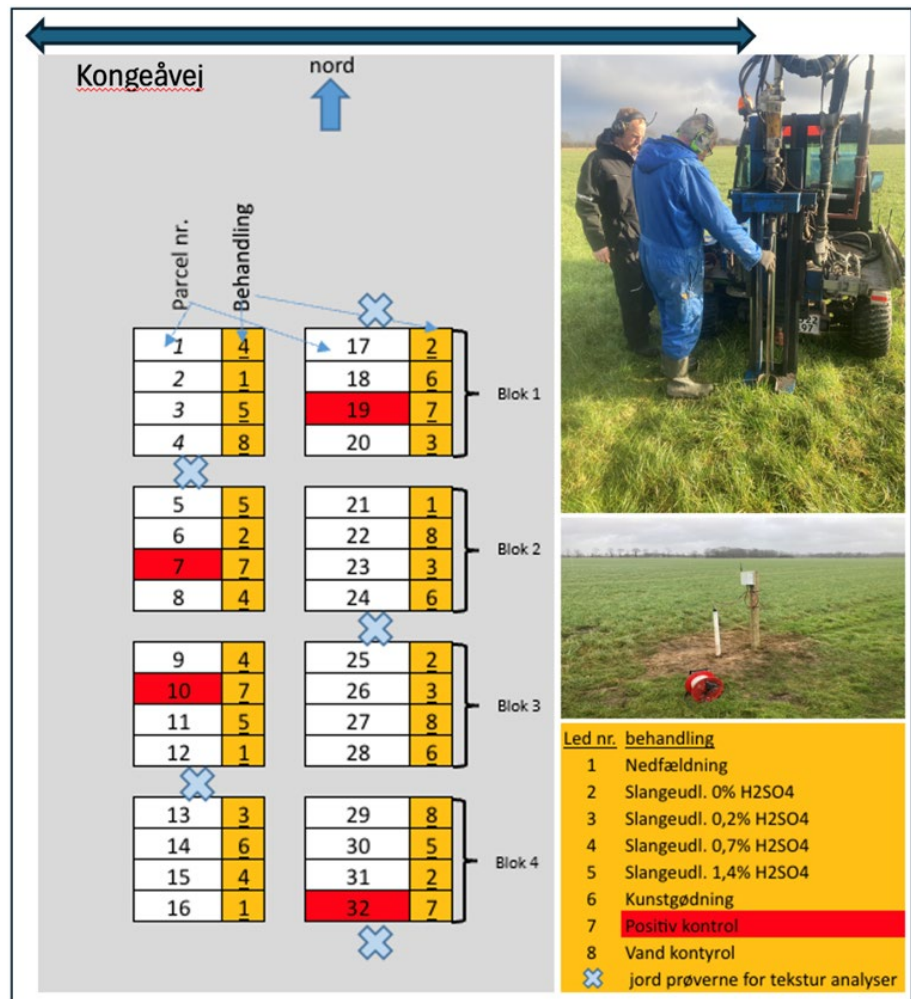
In the field experiment, no effect on enzyme activity was found in the randomly collected soil samples with seven different treatments, while the structures of fungal and invertebrate communities were influenced by increased acidification. Indications of effects on mycorrhizal fungi, a sensitive fungal group, were observed. No significant effects of acidification were observed on the total number of springtails, mites, and microarthropods compared to identical manure application without acidification. The numbers and mass of earthworms were unaffected by the acidified slurry in June (after two applications), whereas negative effects were seen in October after four slurry applications. In addition, soil texture was found to affect the sensitivity of one earthworm species to acidification. The long-term effects of acidified manure applied over multiple years cannot be assessed based on the results of this project, but the effects after one year indicate that it would be relevant to study long-term effects.

## 4 Forsøgsareal og eksperimentelt design (AP1)

Alle markforsøg beskrevet i de efterfølgende arbejdsplaner blev udført i den samme mark, dvs. i det samme eksperimentelle set-up. Forsøgsmarken var beliggende på sandjord i Kongeådalene nær Askov i Sydjylland (lat, lon 55.442152, 9.102387 (WGS84)). Arbejdsplan 3 er et laboratoriestudie udført med jord fra forsøgsmarken.

Et randomiseret blokforsøgsdesign med otte behandlinger af hver fire replikater (32 parceller) blev etableret i kløver-græsplots á 12×12 m<sup>2</sup> på forsøgsmarken (figur 4.1). Der blev anvendt to forskellige metoder til tildeling af uafgasset kvæggylle: nedfældning og slangeudlægning. Slangeudlagt gylle var med forskellige grader af forsuring (0, 2, 7 og 14 kg H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ton gylle). Disse behandlinger blev sammenlignet med kunstgødning, en negativ kontrol med slangeudbragt vand i stedet for gylle og en positiv kontrol med slangeudbragt 0,2 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i vand, dvs. uden gylle. En behandling med kvæggylle blev udført med nedfældning som alm. praksis i riller, hvorved ammoniakfordampning forhindres uden forsuring til sammenligning med forsuringen med slangeudlægning. Med undtagelse af den positive kontrol blev alle behandlinger (se Tabel 5.1) udført fire gange på forsøgsmarken: 27.-28. marts, 31. maj-1. juni, 28. juni og 18. august. Grundkarakterisering af alle 32 plots i pløjelaget har vist, at forsøgsområdet er homogent med JB3 og en svag gradient med faldende humus, 8 % point mindre finsand i blok 2, 1 % point mindre ler i blok 4, men ingen forskel i grovsand mellem blokkene. Pga. tørke blev der kunstvandet med 45 mm primo juni. Tabel 4.1 viser de udførte behandlinger. Den negative kontrol med vand og kunstgødningsbehandlingen blev tilsat samme mængde vand som gylleplottene. Den positive kontrol blev udbragt samtidig med anden gylleudbringning. Formålet med den positive kontrol var at demonstrere, at vores undersøgelsesmetoder kan måle ændringer i jordens biota som følge af de udførte behandlinger.

**Figur 4.1.** Måling af ændringer i kløvergræsmarken med otte behandlinger. Billederne viser udtagning af jordprøver og et punkt til måling af grundvandsstanden.



**Tabel 4.1.** Oversigt over de udførte behandlinger i forsøgsmarken.

Behandlingsnr.	Kode	Udført behandling
1	DI	Nedfældning af kvæggylle uden H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (standard-metode).
2	S0	Slangeudlægning af kvæggylle uden H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (alternativ til nedfældning).
3	S2	Slangeudlægning af kvæggylle med 2 kg H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pr. tons gylle (0,2 %).
4	S7	Slangeudlægning af kvæggylle med 7 kg H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pr. tons gylle (0,7 %).
5	S14	Slangeudlægning af kvæggylle med 14 kg H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pr. tons gylle (1,4 %).
6	CF	Kunstgødning med gødningsværdi svarende til den forventede udnyttelse af kvælstof i gyllen i behandling 1-5, blev vandet ligesom vandkontrol (behandling 8).
7	PC	Positiv kontrol, samme mængde vand som mængde gylle i behandling 1-5, tilsat 2 kg H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pr. tons vand (0,2%; pH=1,7)), slangeudlagt samtidig med anden udbringning af gylle.
8	H <sub>2</sub> O	Vandkontrol, samme mængde vand slangeudlagt som mængde gylle i behandling 1-5.

## 5 Risikovurdering for udvaskning af sulfat og mobilisering af fosfor og tungmetaller (AP2)

### 5.1 Formål

Formålet med arbejdsplanen 2 (AP2) var at undersøge, om der er risiko for udvaskning af sulfat og mobilisering af fosfor og tungmetaller som følge af tilsætning af svovlsyre ved udbringning af gylle.

### 5.2 Metode

Risiko for udvaskning af sulfat og fosfat blev vurderet ud fra målinger af jordens indhold af vandopløseligt sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) og fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ) i kombination med modelberegnet transport af vand og ikke-reaktivt stof i perioden efter tildeling af gylle med forskellige grad af syretilsætning. Modellering af ikke-reaktiv stoftransport i jorden anvendes i denne sammenhæng til at adskille effekter af behandlingstidspunkter i forhold til vandstrømning fra effekter af forskellige forsøgsbehandlinger.

Transport af vand og ikke-reaktivt stof blev beregnet med rodzonemodellen Daisy (Hansen et al. 1990, Hansen 2002). Den beregnede vandbalance blev indledningsvist sammenholdt med målte grundvandsniveauer for at sikre, at vandbevægelse gennem jorden var realistisk. Herefter blev beregnede koncentrationer af et ikke-reaktivt stof i tre jorddybder sammenholdt med de målte koncentrationer af henholdsvis sulfat og fosfat.

### 5.3 Målinger af $\text{SO}_4^{2-}$ og $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ i jorden

**Tabel 5.1** Oversigt over tidspunkter for forsøgsbehandlinger med tilsætning af forskellige mængder syre til den udbragte kvæggylle samt tidspunkter for udtagning af jordprøver til koncentrationsbestemmelse. Herudover er tidspunkter for kunstvanding angivet.

Dato	Aktivitet	Mængder (ca.)
9. februar 2023	Udtagning af jordprøver i 3 dybder	
27. marts 2023	Forsøgsbehandlinger med kvæggylle	29 ton gylle/ha med forskelligt syreindhold
31. maj 2023	Forsøgsbehandlinger med kvæggylle	29 ton gylle/ha med forskelligt syreindhold
2. juni 2023	Vanding	25 mm
11. juni 2023	Vanding	25 mm
28. juni 2023	Udtagning af jordprøver i 3 dybder	
28. juni 2023	Forsøgsbehandlinger med kvæggylle	29 ton gylle/ha med forskelligt syreindhold
18. august 2023	Forsøgsbehandlinger med kvæggylle	29 ton gylle/ha med forskelligt syreindhold
25. august 2023	Vanding	25 mm
28. september 2023	Udtagning af jordprøver i 3 dybder	
24. februar 2024	Udtagning af jordprøver i 3 dybder	

Forsøgsplanen er nærmere beskrevet i kapitel 1. Herudover er der i tabel 5.1 vist en oversigt over tidspunkter for henholdsvis forsøgsbehandlinger og jordprøveudtagning. Der blev udtaget jordprøver i tre dybder (0-5 cm, 5-30 cm og 75-100 cm) i alt fire gange. Første gang var den 9. februar 2023, dvs. før den første tildeling af gylle og tre gange, efter at forsøgsbehandlingerne blev påbegyndt.

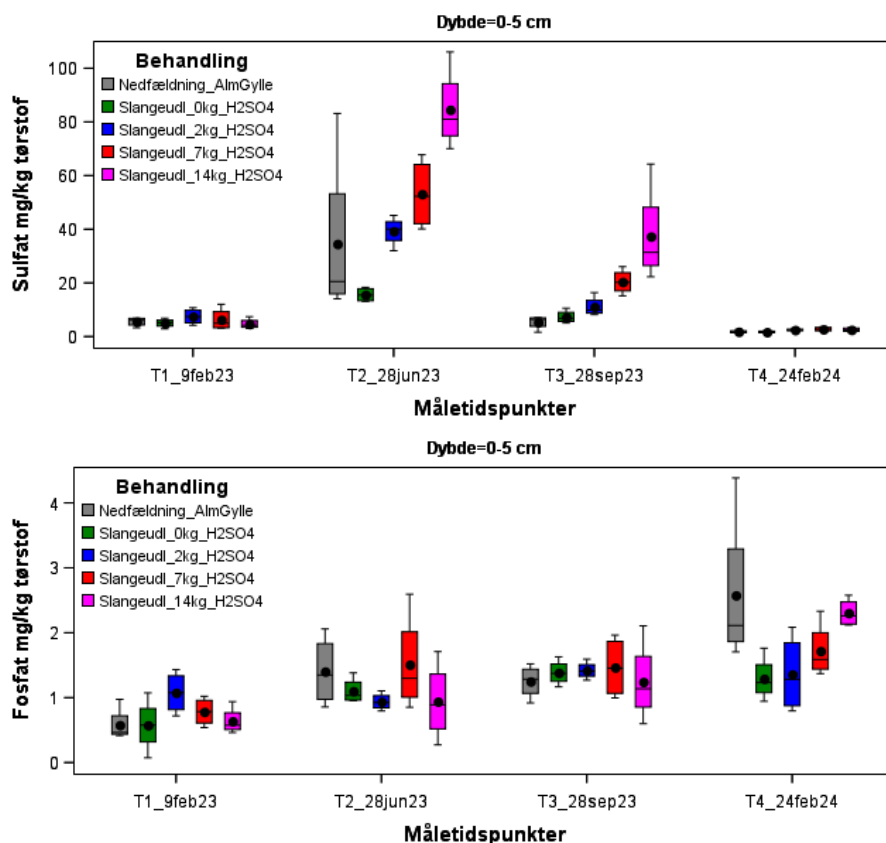
Koncentrationerne af vandopløselige stoffer blev bestemt i vandige jordekstrakter. Til dette formål blev ca. 10 gram frisk jord rystet med 200 ml deioniseret vand i 12 timer. Efter filtrering af ekstrakterne blev de opløste stoffer analyseret med en ICP (Agilent 5800) på Aarhus Universitet ved hjælp af standardmetoden (DS/EN 16170:2016).

I figur 5.1, 5.2 og 5.3 er vist målte koncentrationer af  $\text{SO}_4^{2-}$  og  $\text{PO}_4^{3-}$ -P i tre dybder ved fem forskellige behandlinger. Det ses, at sulfat bliver transporteret gennem jorden, samt at koncentrationerne øges med øget tilsætning af svovlsyre. Forskellen mellem behandlingerne er signifikante i alle tre dybder. Denne sammenhæng ses ikke for fosfat.

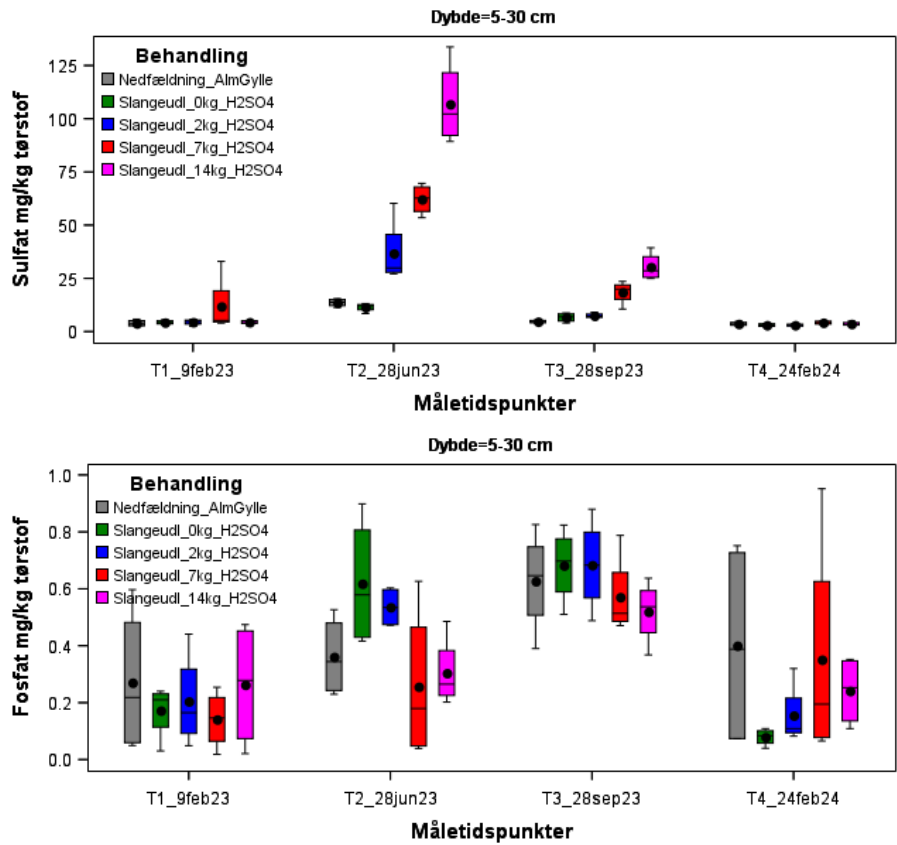
For  $\text{SO}_4^{2-}$ -koncentrationerne er der statistisk signifikant forskel mellem behandlingerne i alle dybder på de to måletidspunkter i juni og september. Dette skyldes, at den tilførte mængde  $\text{SO}_4^{2-}$  med svovlsyren øges ved behandlingerne, samt at en del af den tilførte  $\text{SO}_4^{2-}$  er mobilt.

For  $\text{PO}_4^{3-}$ -P-koncentrationerne er der statistisk sikker forskel mellem behandlingerne i de to øverste dybder, men ikke i 75-100 cm, hvor koncentrationerne generelt er lave på alle måletidspunkter uanset behandling. Ses der visuelt på tidsserierne af målte koncentrationer af  $\text{PO}_4^{3-}$ -P i hhv. 0-5 cm dybde og 5-30 cm dybde, er der et mindre fald i de gennemsnitlige  $\text{PO}_4^{3-}$ -P-koncentrationer med øget tilførsel af syre på de to første måletidspunkter (juni og september), men en omvendt effekt med stigende koncentrationer med øget tilførsel af syre på det sidste måletidspunkt i februar 2024. Dette kan dels hænge sammen med, at  $\text{PO}_4^{3-}$ -P optages af græsafgrøden i sommerperioden, samt at den tilsatte syre medvirker til at begrænse/forsinke omsætningen af det organisk bundne P i gyllen, fx på grund af reduceret enzymaktivitet (Fangueiro et al. 2015), så dannelsen af  $\text{PO}_4^{3-}$ -P og muligheden for udvaskning forsinkes.

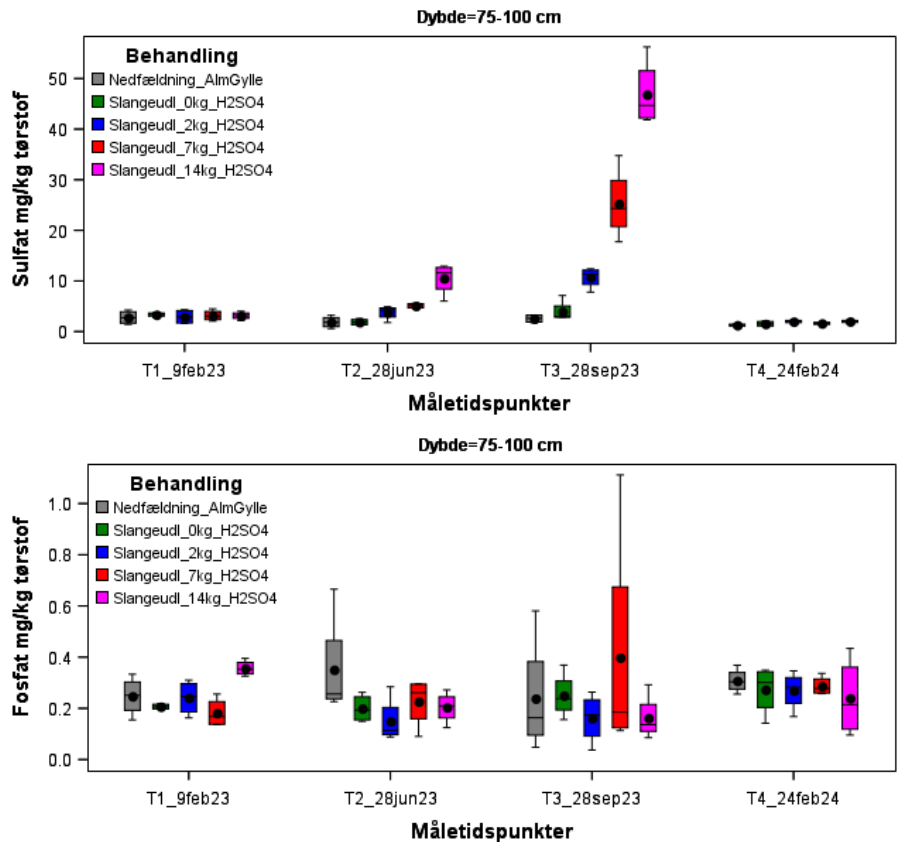
**Figur 5.1** Målte koncentrationer af sulfat (øverst) og fosfat (nederst) i 0-5 cm dybde ved fem forskellige behandlinger, hhv. nedfældning og slangeudlægning af gylle med og uden syretilsætning samt slangeudlægning af gylle med øget syretilsætning. Forsøgsbehandlingerne med forskellige niveauer af syretilsætning i den udbragte gylle blev foretaget fire gange i løbet af vækstsæsonen, henholdsvis 27. marts, 31. maj, 28. juni og 18. august 2023. X-aksen viser prøvetagningstidspunkt.



**Figur 5.2.** Målte koncentrationer af sulfat (øverst) og fosfat (nederst) i 5-30 cm dybde ved fem forskellige behandlinger, hhv. nedfældning og slangeudlægning af gylle uden syretilsætning samt slangeudlægning af gylle med øget syretilsætning. Forsøgsbehandlingerne med forskellige niveauer af syretilsætning i den udbragte gylle blev foretaget fire gange i løbet af vækstsæsonen, henholdsvis 27. marts, 31. maj, 28. juni og 18. august 2023. X-aksen viser prøvetagningstidspunkt.



**Figur 5.3.** Målte koncentrationer af sulfat (øverst) og fosfat (nederst) i 75-100 cm dybde ved fem forskellige behandlinger, hhv. nedfældning og slangeudlægning af gylle uden syretilsætning samt slangeudlægning af gylle med øget syretilsætning. Forsøgsbehandlingerne med forskellige niveauer af syretilsætning i den udbragte gylle blev foretaget fire gange i løbet af vækstsæsonen, henholdsvis 27. marts, 31. maj, 28. juni og 18. august 2023. X-aksen viser prøvetagningstidspunkt.





## 5.4 Beregning af perkolation

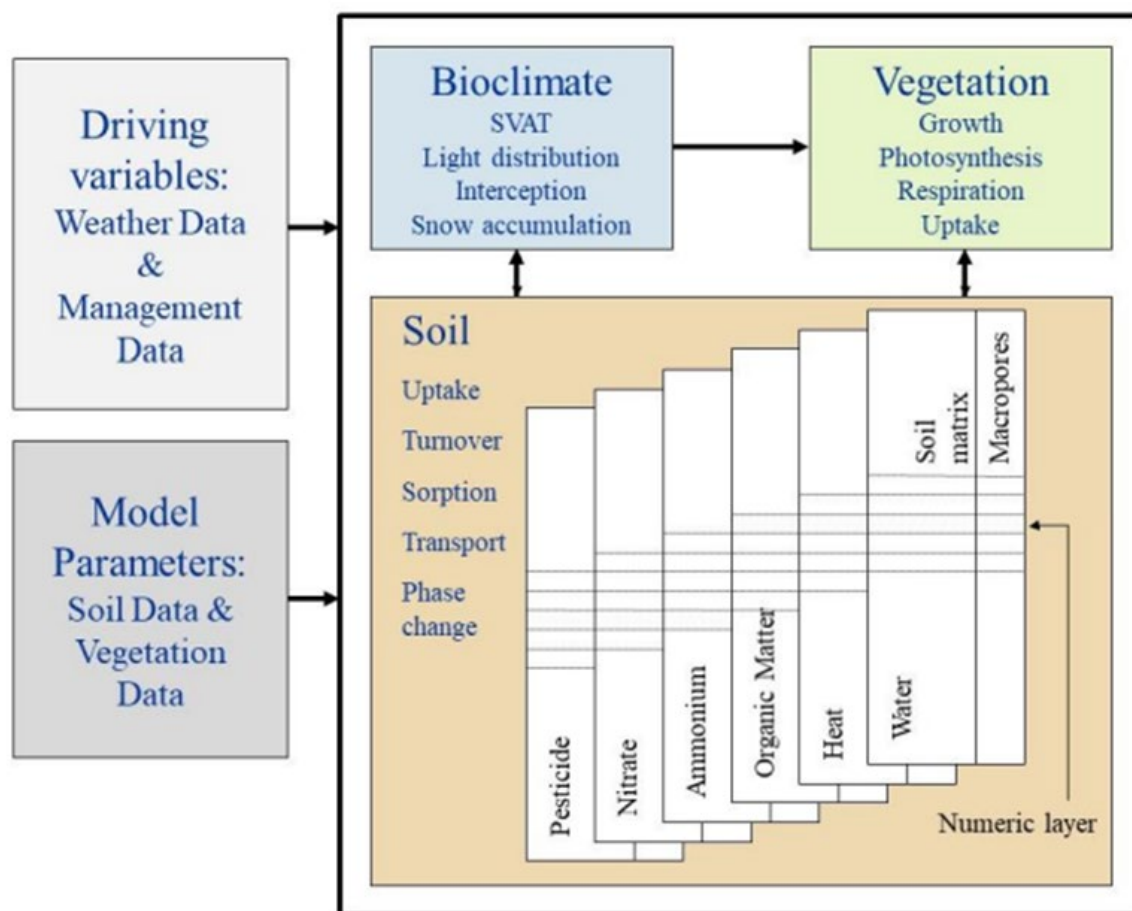
Transport af vand og ikke-reaktivt stof blev beregnet med rodzonemodellen Daisy på baggrund af klimadata målt på Askov Forsøgsstation og indsamlede data om jordens tekstur i forsøgsområdet. Vandbalancen blev kalibreret mod kontinuerede målinger af grundvandsstanden i området.

### 5.4.1 Daisy-modellen

Daisy er et dynamisk procesbaseret modelsystem, der beskriver hovedprocesser involveret i transport og omsætning af vand, kvælstof og kulstof i landbrugsdyrkningsystemer (Hansen et al. 1990, Hansen 2002). Desuden kan beregninger af reaktive eller ikke-reaktive kemikaliers skæbne inkluderes (fx pesticider).

Modellsystemet giver mulighed for, at brugeren kan vælge forskellige procesbeskrivelser for den samme proces, fx forskellige algoritmer for referencefordampning, transportprocesser, sorptions-isothermer m.m.

Daisy blev udviklet på Den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole i Danmark i anden halvdel af 1980'erne. Siden da er modellen blevet og bliver stadig videreudviklet og forbedret, i takt med at ny viden fra den løbende forskning bliver indarbejdet i modellen. Yderligere information kan findes på Københavns Universitets hjemmeside: <https://daisy.ku.dk/>



**Figur 5.4** Schematisk oversigt over processer i Daisy (Hansen 2002). Hovedmodulerne i modellen er beskrivelserne af udvikling i bioklima som følge af klimatiske forhold, vegetationsudvikling og transport- og omsætningsprocesser i jorden.

I dette projekt er den modelberegnete vandbalance brugt til at beregne den daglige perkolation af vand i marken for at estimere risikoen for udvaskning af sulfat og fosfat fra rodzonen ved de forskellige behandlinger.

Vandbalancen er beregnet med anvendelse af daglige klimadata som drivvariable. Herudover er de hydrauliske forhold i jorden beskrevet ud fra målinger af tekstur i de øverste jordlag i forsøgsområdet. Endelig beskrives afgrødernes udvikling ud fra information om afgrødetype, gødskning og vanding i marken.

#### 5.4.2 Klimadata

Daglige klimadata fra DMI's klimastation i Askov (st. nr. 610900) for perioden 2013-2024 er anvendt i beregningerne. Der benyttes daglige værdier af nedbør, temperatur (gennemsnit, min. og maks.) samt globalindstråling. Den målte nedbør er korrigeret for vindpåvirkning, opfugtning samt målertype som anbefalet af Vejen et al. (2021). Huller i nedbørstidsserien er udfyldt med data fra det nærmeste af DMI's 10 km nedbørsgrids.

Referencefordampning beregnes af Daisy ud fra de tilgængelige klimadata. I de konkrete beregninger er referencefordampningen beregnet med Hargraeves-formlen (Hargraeves & Samani 1985, Hargraeves & Allen 2003), der anvendes som default af Daisy på baggrund af de klimadata, der var til rådighed i projektet. Hargraeves-formlen anvender daglige værdier for minimum, maksimum og middel lufttemperatur samt globalindstråling som input. Potentiell fordampning beregnes ligeledes af Daisy ud fra standard afgrødekoeficienter for danske afgrøder.

#### 5.4.3 Jordbundsdata

Der er udført fem randomiserede profilundersøgelser i forsøgsområdet, hvor der er udtaget prøver til måling af tekstur og tør massefylde i fem dybder. Teksturanalyserne er benyttet direkte i Daisy til at beregne de hydrauliske egenskaber ud fra to forskellige pedo-transferfunktioner, henholdsvis HYPRES (Wösten et al. 1998) og Cosby (Cosby et al. 1984). De anvendte teksturdata er vist i tabel 5.2.

**Tabel 5.2.** Teksturdata og volumenvægte anvendt i Daisy (gennemsnit af fem jordprofiler)

Dybe	Ler (%)	Silt (%)	Finsand (%)	Grovsand (%)	Humus (%)	Volumenvægt (g/cm <sup>3</sup> )
0-15 cm	6,2	6,4	23,6	58,1	5,5	0,95
15-30 cm	7,0	5,1	24,6	57,8	5,6	1,06
30-50 cm	6,8	5,0	23,7	59,8	4,7	1,17
50-75 cm	5,1	2,6	23,4	66,4	2,5	1,68
75-100 cm	2,9	1,6	16,4	77,8	1,4	1,73

#### 5.4.4 Nedre randbetingelse

I forbindelse med projektet er der etableret tre piezometerrør til måling af grundvandsstanden. De målte grundvandsdata viser, at dybden til grundvandet i måleperioden har svinget mellem ca. 1,4 m og 3,1 m under terræn. Den nedre rand er ud fra dybden til grundvandet valgt som en dynamisk grundvandsrand, der styres af en relativt impermeabel aquitard. De målte grundvandsdybder er desuden anvendt til kalibrering og vurdering af den beregnede perkolation.

### 5.4.5 Markdrift

I 2023 er der dyrket græs på forsøgsområdet.

De enkelte forsøgsplots har modtaget forskellige behandling med hensyn til mængden af syretilsætning til gyllen (se kapitel 1), men da formålet med Daisyberegningerne ikke har været at beregne udvaskningen og omsætningen af kvælstof, er der ved perkulationsberegningerne kun benyttet én type gødskning i form af den almindelig kvæggylle uden tilsætning af syre og udlagt med slæbeslanger. Dette er for at sikre, at græsset har tilstrækkeligt kvælstof til vækst og udvikling. Der er i modellen tildelt kvæggylle fire gange i løbet af vækstsæsonen på de tidspunkter, hvor der i forsøgsområdet blev udbragt gylle med forskellige mængder syretilsætning. Herudover er der kunstvandret tre gange i løbet af vækstsæsonen. Der er taget slæt af græsset tre-fire dage inden tildeling af gylle, hvilket er i overensstemmelse med det oplyste.

De anvendte data for gødskning og vanding er vist i tabel 5.3.

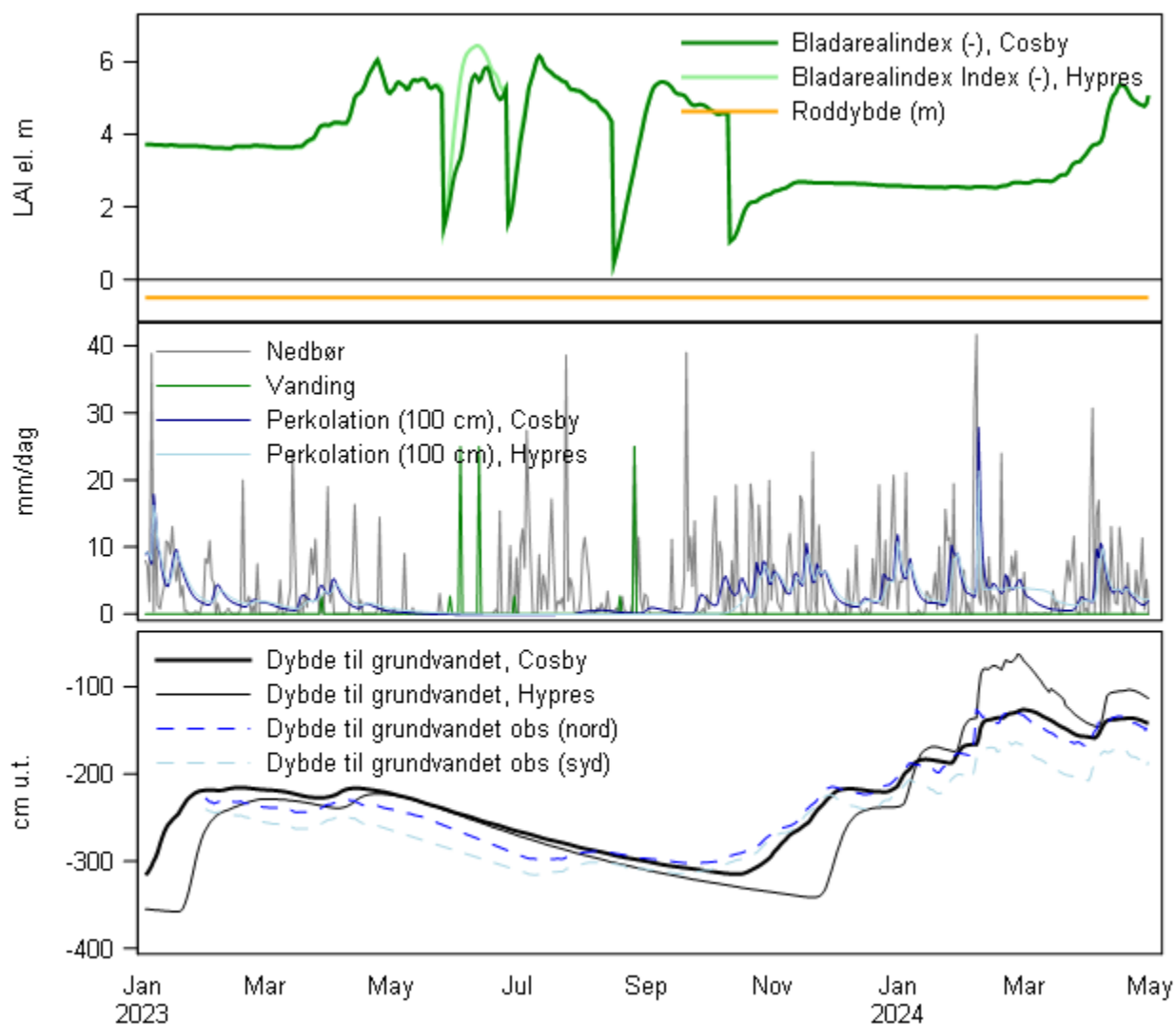
**Tabel 5.3.** Data fra mark- og forsøgsplanen i 2023, der indgår ved beregning af perkulation med Daisy. Der er ved beregningerne ikke skelnet mellem forskellige niveauer af syretilsætning i gyllen, da dette ikke har betydning for beregningerne. Den tildelte mængde N i gyllen indgår i modellen ved beregning af plantevæksten, som afhænger af forsyningen af vand og næringsstoffer. Den tildelte mængde P indgår ved beregning af ikke-reaktiv stoftransport

Dato	Aktivitet	Mængde
27/3	Kvæggylle	29 ton/ha (ca. 84 kg N/ha og 13 kg P/ha)
31/5	Kvæggylle	29 ton/ha (ca. 107 kg N/ha 12 kg P/ha)
2/6	Vanding	25 mm
11/6	Vanding	25 mm
28/6	Kvæggylle	29 ton/ha (ca. 110 kg N/ha og 18 kg P/ha)
18/8	Kvæggylle	29 ton/ha (ca. 107 kg N/ha og 15 kg P/ha)
25/8	Vanding	25 mm

### 5.4.6 Kalibrering af vandbalancen

Dynamikken i den modelberegnete perkulation og grundvandsstand blev indledningsvist sammenholdt med målte grundvandsniveauer i forsøgsområdet for at vurdere, hvilken pedotransfer-funktion der var bedst egnet på den aktuelle jordtype. Beregningerne, der ses i figur 5.5, viste, at de hydrauliske parametre opnået med Cosby-funktionen afspejlede dynamikken i grundvandsniveauerne bedst. Årsagen hertil er, at den konkrete jordtype med mere end 5 % organisk stof og meget lave volumenvægte i de øverste 50 cm og relativt høje volumenvægte i 50-100 cm ligger i periferien af gyldighedsområdet for Hypres-modellen. Ved de videre analyser anvendes således hydrauliske parametre beregnet med Cosby et al. (1984).

Beregnet vandbalance samt målt og beregnet dybde til grundvandet er vist i figur 5.5.



**Figur 5.5.** Tidsserie af beregnet vandbalance samt målt og beregnet dybde til grundvandet i projektperioden med anvendelse af to forskellige pedotransferfunktioner til beskrivelse af jordens hydrauliske egenskaber. Roddybden er uændret gennem beregningsperioden, fordi afgrøden er en flerårig slætgræs, som allerede var etableret året inden forsøgsperiodens start.

#### 5.4.7 Beregnet vandbalance for 2023

Beregnete månedsværdier af vandbalancen er vist i tabel 5.4. Det fremgår, at maj og juni måned var meget tørre, hvilket betyder, at den beregnede perkolation var meget lille i denne periode.

**Table 5.4** Modelberegnet vandbalance for 2023 på månedsbasis (mm/måned). Perkolations er opgjøret i 1 m dybde.

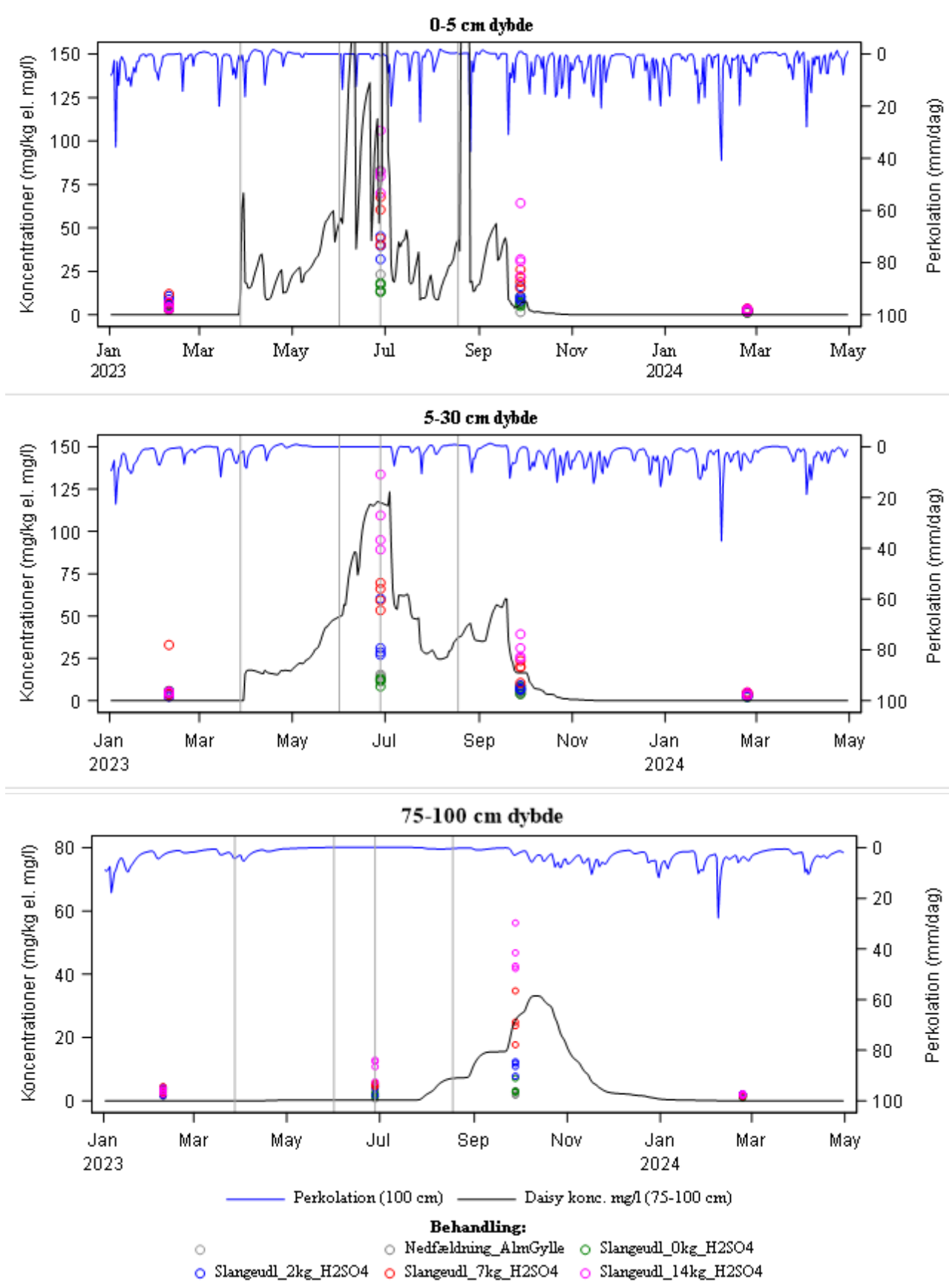
Måned	Nedbør	Vanding + tilført med gylle	Potentiel fordampning	Aktuel fordampning	Perkolations (1 m dybde)
1	174	0	8	8	199
2	68	0	15	15	59
3	117	3	32	32	58
4	58	0	66	66	53
5	14	3	109	88	3
6	36	53	148	91	0
7	194	0	124	124	0
8	96	28	92	91	11
9	104	0	73	73	24
10	189	0	26	26	129
11	153	0	10	10	164
12	125	0	5	5	95

### 5.5 Beregning af ikke-reaktiv stoftransport

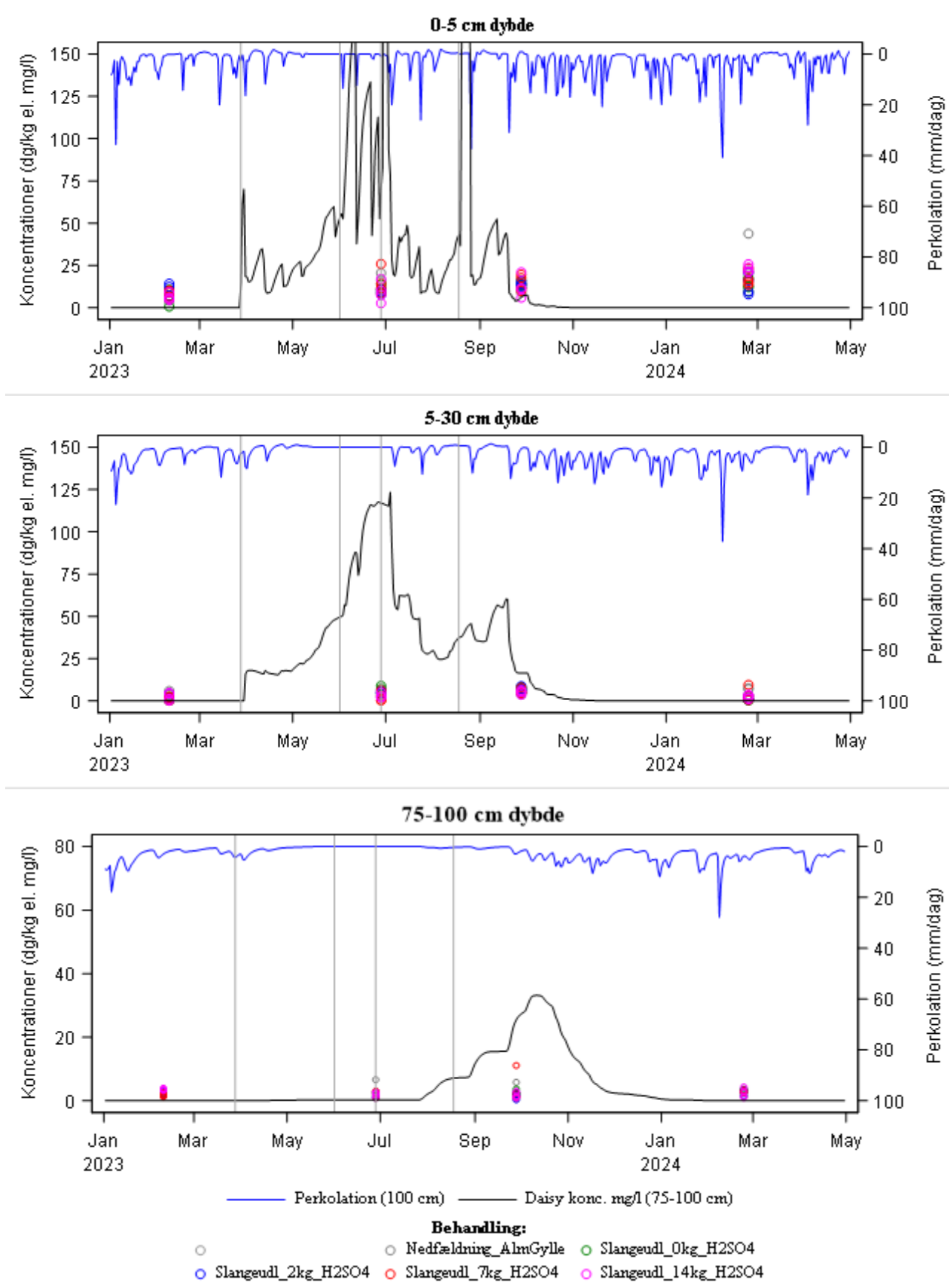
Teoretisk transport af et ikke-reaktivt stof gennem jorden blev beregnet ved brug af Daisy-modellens stoftransportmodel, som beskriver advektions- og dispersionsprocesser.

Et teoretisk ikke-reaktivt stof med samme molvægt som  $\text{PO}_4$  blev tilføjet til Daisy-beregningerne på de samme tidspunkter som de øvrige gyllebehandlinger og i mængder svarende til den tilførte mængde P i gyllen.

I figur 5.6 er de målte  $\text{SO}_4^{2-}$ -koncentrationer vist sammen med det beregnede koncentrationsforløb for et ikke-reaktivt stof i tre dybder. Det ses, at målt og beregnet koncentrationsforløb følges ad, hvilket indikerer, at transport af  $\text{SO}_4^{2-}$  gennem rodzonen er sammenlignelig med et ikke-reaktivt stof. Denne sammenhæng ses ikke for  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ , sandsynligvis på grund af P-sorption og optag i planterne/mikroorganismer (figur 5.7).



**Figur 5.6.** Målte sulfatkoncentrationer i tre dybder ved forskellige behandlinger (farvede prikker) samt beregnet perkolations (blå kurve) og koncentrationsforløb for et ikke-reaktivt stof beregnet med Daisy (sort kurve). De lodrette grå streger angiver behandlingstidspunkterne.



**Figur 5.7.** Målte fosfatkoncentrationer i tre dybder ved forskellige behandlinger (farvede prikker) samt beregnet perkolations (blå kurve) og koncentrationsforløb for et ikke-reaktivt stof beregnet med Daisy (sort kurve). De lodrette grå streger angiver behandlingstidspunkterne

## 5.6 Opsummering af resultater fra AP2

På baggrund af de gennemførte målinger og beregninger kan det ikke udelukkes, at øget udbringning af svovlsyre med gylle kan give anledning til øget udvaskning af  $\text{SO}_4^{2-}$  til vandmiljøet (grundvandet, vandløb, søer). Tilsvarende effekt ses ikke for  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ . Eventuelle effekter på udvaskning ved langvarig udbringning af forsuret gylle kan ikke vurderes ud fra resultaterne fra dette projekt. Langvarige effekter af forsuring i form af mere surt miljø i overjorden vil i praksis modvirkes af hyppigere tilførsel af kalk.

Der skal tages forbehold for, at der kun indgår et enkelt forsøgsår, som var præget af en meget tør vækstsæson. Eventuelle effekter kan derfor være anderledes i år med mere nedbør i vækstsæsonen.



## 6 Rumlig udbredelse af effekter i jord-gylle-miljøer (AP3)

### 6.1 Formål

Formålet med AP3 var at undersøge effekter af den rumlige udbredelse af gylle. Dette blev gjort i laboratorieforsøg med jordsøjler, hvor kvæggylle blev tilført midten af jordoverfladerne. Hypotesen er, at den rumlige udbredelse vil påvirke de fysiske-kemiske parametre, de ekstracellulære enzymaktiviteter og mikrobiomet. Formålet med AP3 var en mere detaljeret undersøgelse af den rumlige effekt af gylle med og uden forsuring på jordens ekstracellulære enzymaktivitet og aktive mikrobiom målt som ribosomalt RNA. Analyse af RNA giver bedre information om, hvilke mikroorganismer der er aktive ift. DNA, som bidrager med information om forekomst af organismer. Forsuringen af gyllen med 1,4 % svovlsyre forventes at have størst effekt i nærmiljøet, dvs. lige under gyllen, mens effekten vil aftage med den vertikale og horisontale afstand fra positionen, hvor gyllen er udlagt. Desuden forventes forsuringen temporært at have effekt på ekstracellulær enzymaktivitet (EEA) og ændre mikrobiomets diversitet og struktur. Inden for projektets rammer var det ikke muligt at kvantificere mikrobiomet ved fx direkte tælling af celler eller biomassemål, hvilket ville have øget forståelsen af effekter på mikrobiomet og jordens sundhed. Forsøgene blev udført i mindre jordkerner med centralt tilført gylle.

### 6.2 Metoder

#### 6.2.1 Jordsøjler

Forsøgene blev udført med kvæggylle forsuret med 0, 0,2 og 1,4 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  samt en positiv kontrol med 0,2 % svovlsyre og en negativ kontrol med vand i jordsøjler på 5 cm × 6,4 cm (h × d), som tidligere anvendt af Meng et al. (2022). Våd jord (208 g) blev pakket til en densitet på 1,3 g/cm<sup>3</sup>, og vandindholdet blev justeret til 20 %, hvorefter enderne blev forseget med perforeret parafilm. Jordkernerne blev placeret i mørke kasser foret med fugtigt papir ved 15°C i hele forsøget. Jordkernerne var løftet fri af bunden ved at stå på petrisåle for at undgå, at papiret virkede som væge. Efter en uge blev der tilsat 6,9 g gylle eller tilsvarende vandmængde inde i en mindre cylinder (ø = 20 mm) placeret centralt på jordkernen for at begrænse gyllespredningen. Den mindre cylinder blev fjernet efter seks timer.

Efter hhv. 1, 8 og 28 dages inkubering blev der udtaget prøver fra tre dybder; hhv. 0-5, 5-15 og 35-45 mm under overfladen efter fjernelse af gyllen, fra både den centrale del, hvor gyllen var tilført, samt fra den ydre del af jordsøjlen. Jordkernen blev presset ud af akrylcylinderen og skiveskåret med en metalpartel, hvorefter den indre sektion blev udstanset med et hult cylinderstempel (ø = 40 mm). Spatelen og stemplet blev skyllet i 2 % hypochlorit, vasket i demineraliseret vand og tørret med køkkenrulle mellem hver jordskive. I disse jordprøver blev vandindhold, glødetab, kvælstofforbindelser og fosfor, pH, ekstracellulær enzymaktivitet samt prokaryot- og svampesamfundenes struktur og diversitet bestemt.

## 6.2.2 Fysisk-kemiske analyser

Vandindholdet blev bestemt ved tørring ved 105 °C i et døgn, hvorefter glødetab (loss on ignition = LOI) blev bestemt ved udglødning ved 450 °C natten over. Nitrit, ammonium og fosfat blev målt som beskrevet i AP2. pH blev målt i en 1:10 jord:vand suspension.

## 6.2.3 Ekstracellulær enzymaktivitet

Ekstracellulær enzymaktivitet blev undersøgt ved anvendelse af fluorokrom-mærkede substrater, hvor hastigheden af fraspaltningen af det fluorescerende MUF måles som udtryk for ekstracellulær enzymaktivitet (EEA) som beskrevet af Hendriksen et al. (2016). Følgende hydrolytiske enzymaktiviteter blev bestemt: aarylsulfatase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, cellobiosidase,  $\beta$ -xylosidase, kitinase, aarylsulfatase og fosformonoesterase.

En 1:10 jord:vand suspension blev ultralydsbehandlet i fem minutter, rystet på en Genogrinder ved 1000 rpm i fem minutter og til sidst centrifugeret ved 750 rpm i 10 minutter ved 4°C. 200  $\mu$ l af denne jordsupernatant, 10  $\mu$ l MOPS-buffer og 40  $\mu$ l relevant MUF-substrat blev pipetteret i individuelle brønde i mikrotiterplader, og enzymernes fraspaltning af det fluorescerende MUF blev målt i en Clariostar-pladelæser (460 nm emission, 355 nm excitation) over 90 min. Efter datatrimning som beskrevet i Christiansen et al. (2025) blev enzymaktiviteten beregnet ved hjælp af standardkurver som i Johansen et al. (2005), udtrykt som nmol MUF pr. g tør jord pr. time (nmol MUF/g/h).

## 6.2.4 Mikrobiomets struktur og diversitet

Baseret på EEA-resultaterne blev mikrobiomets struktur og diversitet undersøgt i et udvalg af jordprøverne: 0-5 mm indre, 0-5 mm ydre, 5-15 mm indre og 35-45 mm indre for hver jordkerne.

Minimum 2,5 g jord blev frosset i flydende kvælstof og opbevaret ved -80°C indtil RNA-ekstraktion. Før ekstraktion af RNA blev jorden frysetørret (Scan-laf Model Coolsafe 55 Lyngø, Danmark) i 72 timer i 50 ml Facon-rør og homo-geniseret ved hjælp af 15 metalperler ( $\varnothing = 2,4$  mm) i en Geno/Grinder 2000 (SPEX CertiPrep, Metuchen, NJ, USA) ved 1500 rpm i 3 min. RNA blev ekstraheret med kittet NucleoBond RNA Soil Mini (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Tyskland) ifølge producentens protokol.

Amplikonbiblioteker blev udført essentielt som tidligere beskrevet (Buivydaite et al. 2023) med primere for prokaryoter (16 rRNA-genet, Takahashi et al. 2014) og svampe (ITS2-regionen, Ihrmark et al. 2012), hvorefter de to amplikonbiblioteker blev sekventeret på Illumina MiSeq på Institut for Miljøvidenskab, AU. Bioinformatisk analyse og statistik blev udført som beskrevet i Buivydaite et al. (2023). Signifikante forskelle i alfa-diversitet blev bestemt ud fra ANOVA af Shannon diversitetsindeks, mens forskelle i struktur blev analyseret med "permutational analysis of variance" (PERMANOVA). Alle statistiske analyser blev udført med et signifikansniveau på 5 % ( $p < 0,05$ ).

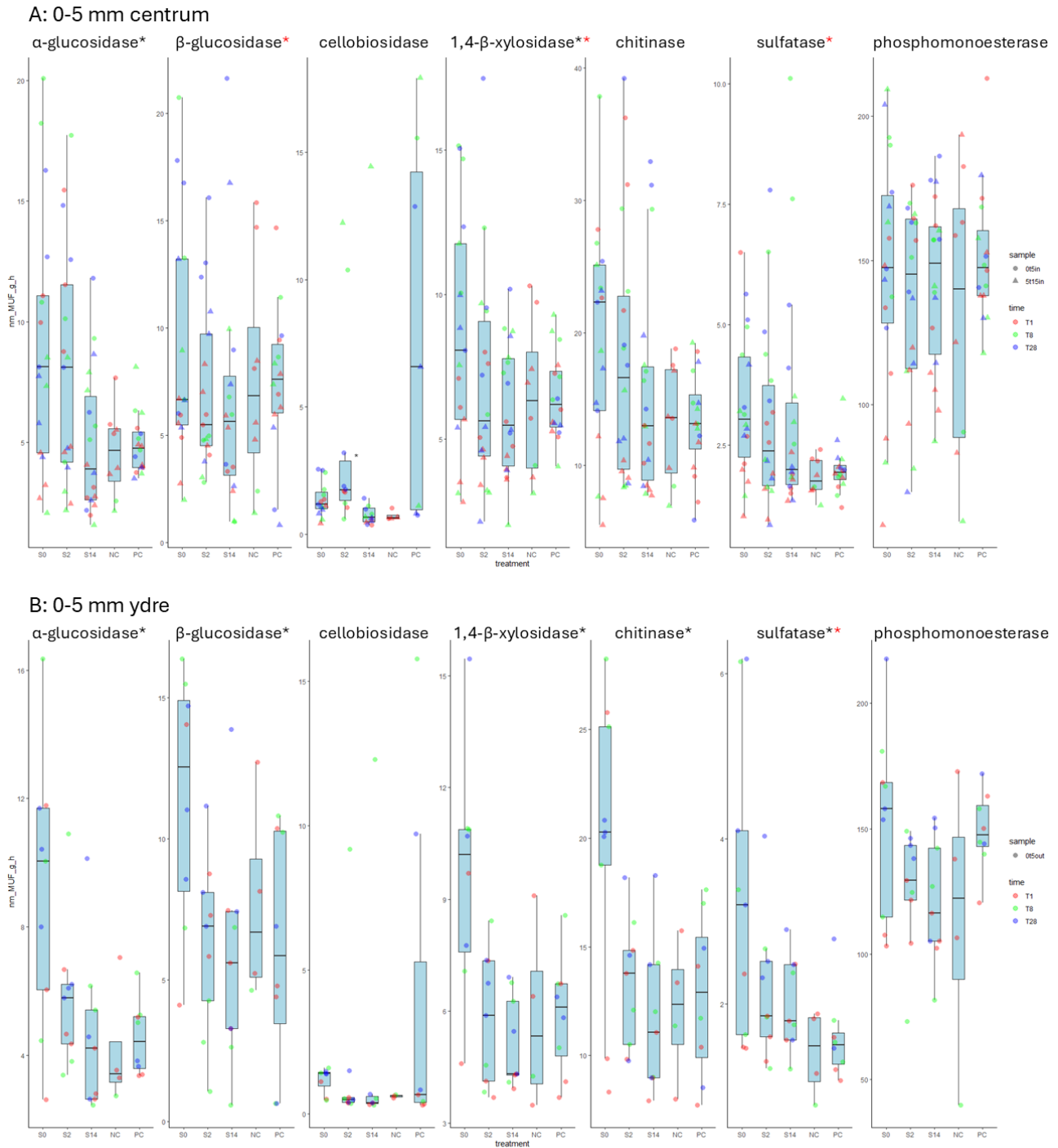
## 6.3 Resultater

### 6.3.1 Effekt af gylleforsuring

Tilførsel af gylle til centrum af jordsøjler havde signifikante effekter på nitrit, ammonium og fosfat i de øverste 5 mm af jorden. I 0-5 mm dybde påvirkede behandlinger og inkuberingstid ikke jordens indhold af organisk stof. Den positive kontrol (PC) og 1,4 % gylleforsuring (S14) sænkede signifikant pH i forhold til gylle med ingen (S0) og 0,2 % syre (S2) samt den negative kontrol (NC). Gyllens bufferkapacitet ser derfor ud til at kompensere for 0,2 % forsuring.

Tilførslen af gylle øgede konsekvent den ekstracellulære enzymaktivitet, hvilket kan tilskrives nedbrydning af organisk stof i gyllen. Den rumlige fordeling af gylle medførte horisontale og vertikale forskelle i både den ekstracellulære enzymaktivitet og mikrobiomets struktur og diversitet over tid (0-28 dage) og som følge af behandlingen.

Den ekstracellulære enzymaktivitet udviste mest markante ændringer i 0-5 mm dybde, hvor enzymaktivitet 0-5 mm under gyllen signifikant ændrede sig over tid for enzymerne  $\beta$ -glucosidase, xylanase og sulfatase, mens behandling med gylle uden og med 0,2 % syre signifikant øgede  $\alpha$ -glycosidase-og xylanaseaktiviteten (figur 6.1A). Uden for gyllens placering i 0-5 mm dybde hæmmede syrebehandlingen interessant nok signifikant alle enzymer undtagen cellobiosidase og phosphomonoesterase (figur 6.1B). I de øvrige dybder var effekterne sporadiske og ikke signifikante.

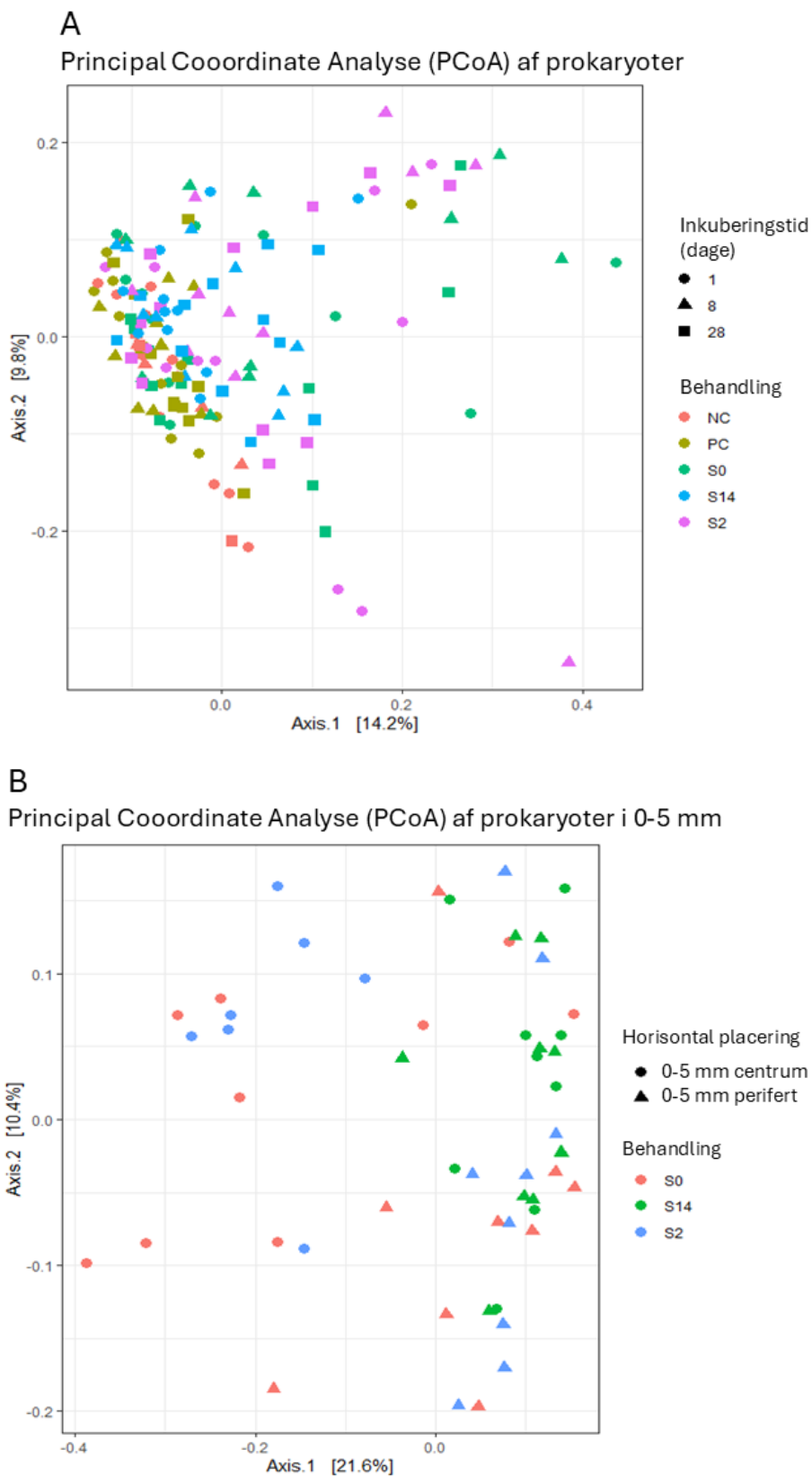


**Figur 6.1.** Ekstracellulær enzymaktivitet af syv forskellige hydrolytiske enzymer i 0-5 mm dybde af A) i centrum under gyllen og B) i området uden for gyllens placering. \*: signifikante effekter af tid; \*\*: signifikante effekter af behandling. Behandlinger: S0: Gylle uden forsuring; S2: gylle med 2 kg H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ton, S14: 14 kg H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ton; NC: negativ kontrol uden gylle; PC: positiv kontrol med 0,2 % svovlsyre uden gylle.

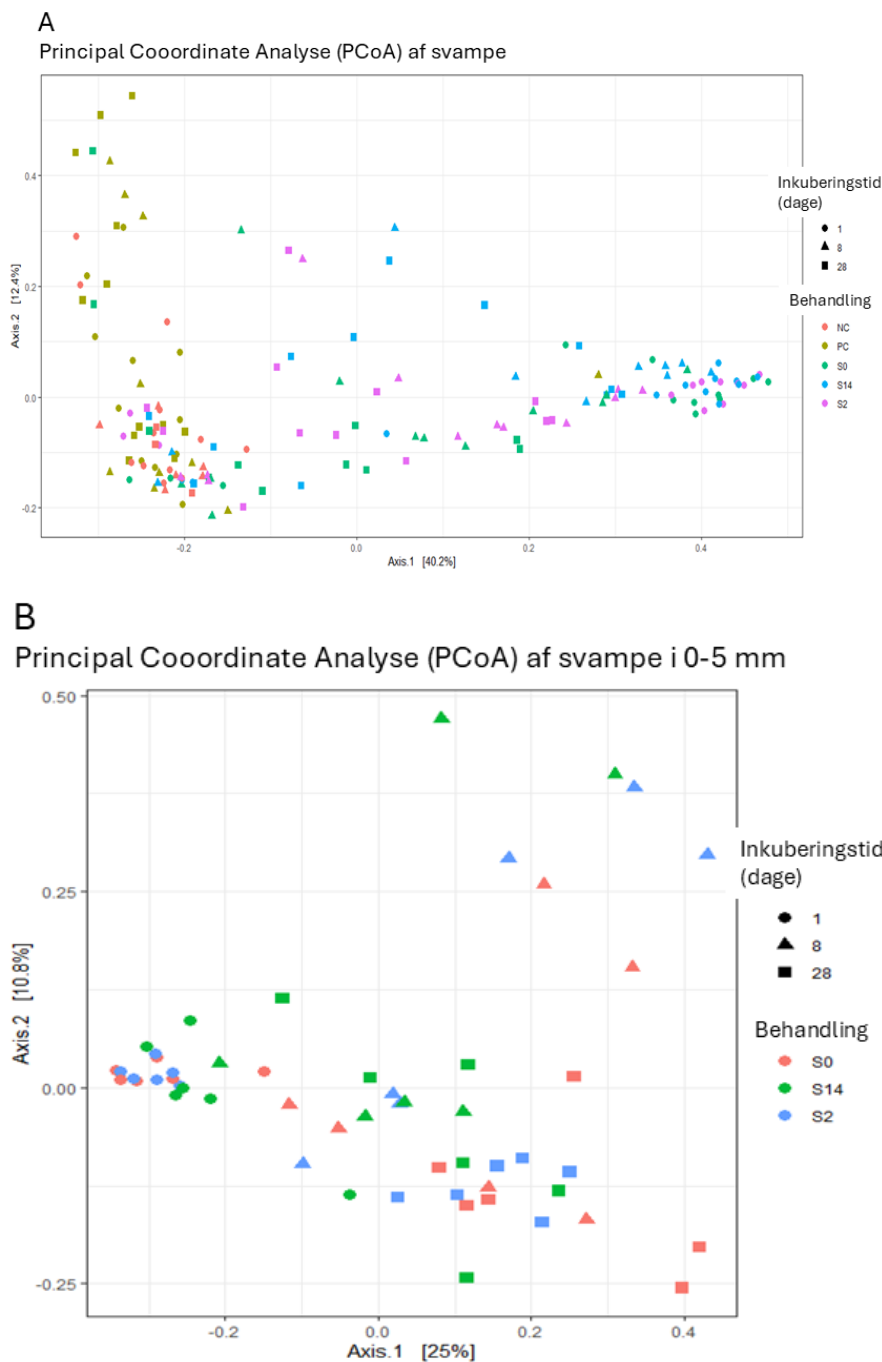
De aktive mikrobielle samfunds diversitet og struktur blev analyseret med sekventering af ribosomalt RNA med to forskellige primersæt, der koder for hhv. prokaryoter (bakterier og archaea) (16S rRNA) og svampe (ITS). I de øverste 5 mm var diversiteten (alfa-diversiteten bestemt med Shannon diversitetsindeks) af prokaryoter højere med forsuret gyllebehandling (S14) end lav-dosis forsuring (S2) og kontrol med gylle uden forsuring. Denne effekt var ikke detekterbar dybere end 5 mm. Overordnet var de aktive prokaryoters samfundsstruktur påvirket af behandlingerne (figur 6.2A), og ligesom for den ekstracellulære enzymaktivitet var påvirkninger af prokaryoterne størst i de øverste 5 mm.

Strukturen af de aktive prokaryotsamfund bestemt ved 16S rRNA amplikonsekventering var signifikant forskellig mellem den positive kontrolbehandling og behandling med gylle uden og med 0,2 % syre, mens gyllebehandling med 1,4 % syre var signifikant forskellig fra gyllebehandling uden og med 0,2 % syre. Dog var der ikke forskel mellem centrum og den ydre del af jordsøjlen, og dybere end 15 mm kunne effekt af gylle ikke detekteres.

**Figur 6.2.** Diversitet af de aktive prokaryoter (bakterier og archaea) i A) de fem forskellige behandlinger efter 1, 8 og 28 dages inkubering og for alle dybder og vertikale placeringer og B) 0-5 mm dybde i hhv. centrum og periferi af jordsøjlen med de tre gyllebehandling. Prokaryotsamfundene er analyseret med amplikonsekventering af 16S rRNA. Behandlinger som i figur 6.1.

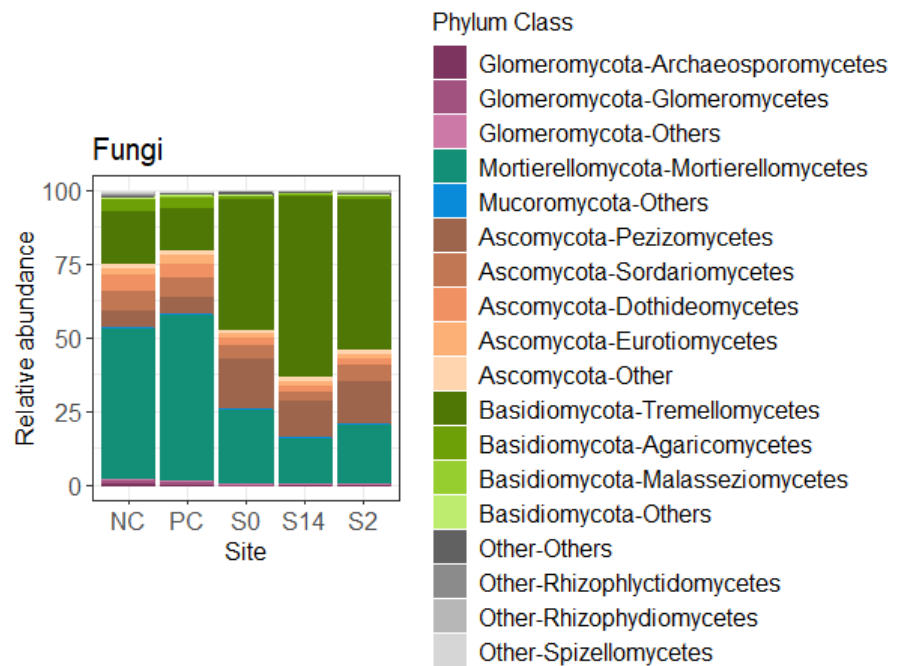


**Figur 6.3.** Diversitet af de aktive svampe i A) de fem forskellige behandlinger efter 1, 8 og 28 dages inkubering og for alle dybder og vertikale placeringer og B) 0-5 mm dybde med de tre gyllebehandlinger efter 1, 8 og 28 dages inkubering. Svampesamfundene er analyseret med amplikonsekventering af ITS RNA. Behandlinger som i figur 6.1.



Svampesamfundenes struktur og diversitet blev tilsvarende undersøgt med amplikonsekventering af ITS RNA (figur 6.3), og der var signifikant forskel mellem behandlingerne og indsamlingstidspunktet. Svampenes diversitet var signifikant lavere ved S14 end både positiv og negativ kontrol samt S0 i de øverste 5 mm. Svampesamfundenes struktur i den positive kontrol med 0,2 % syre uden gylle var signifikant forskellig fra alle andre behandlinger, mens de tre gyllebehandlinger ikke var signifikant forskellige (figur 6.3A). I de øverste 0-5 mm blev samfundene med tiden mere forskellige (figur 6.3B). Den relative forekomst af forskellige svampe var dog tydeligt påvirket af gyllen og yderligere af forsuret gylle (figur 6.4), idet den relative forekomst af Basidiomycota steg, mens den relative forekomst af Mucoromycota faldt ved tilførsel af gylle. Dette kan skyldes omsætning af det organiske stof tilført med gyllen eller aktive svampe indeholdt i gyllen.

**Figur 6.4.** Relativ forekomst af svampe på klasseniveau. Behandlinger som i figur 6.1.



I den positive kontrol og med 1,4 % forsuret gylle var pH signifikant lavere end i de øvrige behandlinger. Samtidig blev nogle af de største forskelle imellem svampesamfundene fundet mellem den positive kontrol (PC) og 1,4 % forsuret gylle (S14) (figur 6.4), hvorimellem pH ikke var signifikant forskellig. Dette udelukker en specifik pH-effekt og antyder en kombineret effekt af tilgængeligt organisk materiale, svampe tilført med gyllen og pH.

### 6.3.2 Opsummering af effekter på mikrobiota i jordsøjleforsøg

- Gylletilførsel oven på jorden i centrum af jordsøjlen havde en betydelig lokal effekt på den ekstracellulære enzymaktivitet i de øverste 5 mm og var stærkt aftagende med dybden ned til 4,5 cm.
- Effekten af den forsurede gylle på enzymaktiviteterne var højere i periferien end i centrum lige under gyllen, hvilket tyder på horisontal transport af gyllevæsken.
- De aktive prokaryotsamfunds diversitet og struktur var påvirket af behandlingerne og især i de øverste 5 mm af 1,4 % forsuret gylle, mens den relative forekomst af forskellige aktive prokaryoter ikke var påvirket. Mikrobiomet i jordlaget fra 5-15 mm var ikke påvirket.
- De aktive svampesamfunds struktur var ligeledes påvirket af behandlingerne og i de øverste lag også af inkuberingstiden (op til 28 dage), mens diversiteten var uændret. Den relative forekomst af aktive svampe var signifikant påvirket af 1,4 % forsuret gylle i det øverste jordlag, hvilket kan have afledte effekter.
- Lokalt havde alle behandlinger med kvæggylle en effekt på den ekstracellulære enzymaktivitet og på struktur af prokaryot- og svampesamfundene, mens effekterne ikke blev detekteret 3-5 cm fra gyllens placering.
- Ud fra dette forsøg er det ikke muligt at vurdere effekt af de målte ændringer i mikrobiomets struktur over længere tid eller på jordens sundhed efter gentagne udbringninger af forsuret gylle.

## 7 Effekter af forsuret gylle på mikroled- dyr, regnorme og mikrobiomet (AP4)

### 7.1 Formål

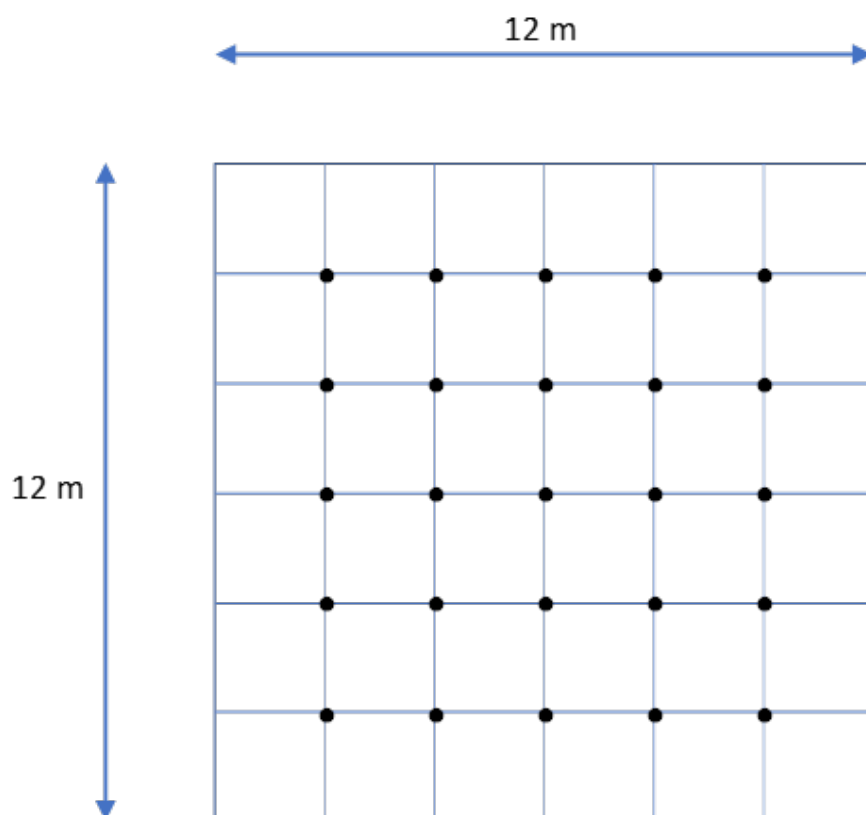
Formålet med AP4 var at undersøge effekten af forsuret gylle på mikroled-  
dyr, regnorme, ekstracellulær enzymaktivitet og mikrobiomet under realistiske  
feltforhold ud fra en hypotese om, at forsuret gylle vil hæmme disse aktiviteter  
og organismer i forhold til ikke-forsuret gylle.

### 7.2 Metoder

I forsøgsmarken (beskrevet i AP1) blev i hvert plot indsamlet tre mikroled-  
dyrprøver og to regnormeprøver (delprøver) efter konventionelle metoder  
(beskrevet nedenfor) i såvel juni som oktober 2023. Placeringen af prøvetag-  
ningen blev valgt tilfældigt ved på forhånd at udvælge tilfældige x- og y-  
koordinater i hvert plot.

Regnorme- og mikroarthropodprøver blev taget 13.-14. juni og 3.-4. oktober,  
hhv. to og syv uger efter gylleudbringning. Prøverne blev udtaget tilfældigt  
inden for de 2 m værn i bruttoparcellen på 12 m x 12 m (figur 7.1), men dog  
altid uden for køresporene.

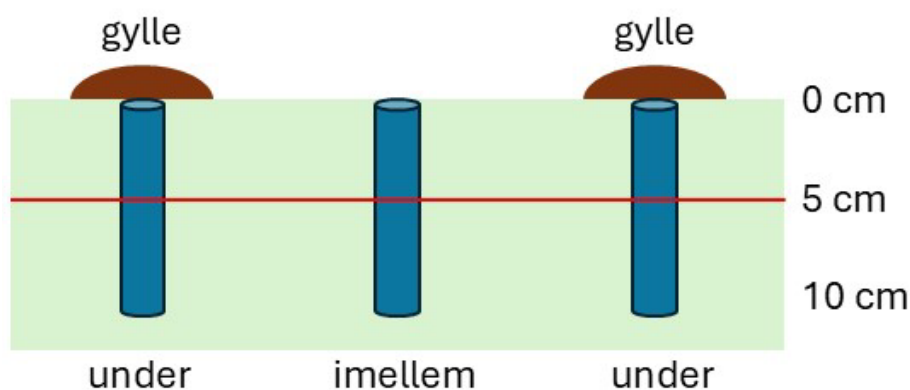
**Figur 7.1.** Grid placeret i "brutto-  
parcellen" og brugt til indsamling  
af tilfældigt fordelte delprøver i et  
enkelt plot





Jordprøver til analyse af ekstracellulær enzymaktivitet og mikrobiomets struktur og diversitet blev indsamlet med jordspyd (ø=2 cm) fra 0-20 cm dybde i hhv. juni (14/6-23, 14 dage efter gyllespredning) og august 2023 (23/8-23, syv dage efter gyllespredning) i de etablerede plots beskrevet i AP1. Ti stik fra hver plot blev udtaget i et Z, opblandet, hvorefter en delprøve blev udtaget. Baseret på resultaterne fra juni, hvor indsamlingen var 14 dage efter gylleudbringning, blev indsamlingen i august udført syv dage efter gylleudbringningen for at optimere muligheden for at se effekt af forsuren. Desuden blev der indsamlet jordprøver fra gyllebehandlingen uden (S0) og med 1,4 % syre (S14) fra jord under og imellem gyllestrengen i dybderne 0-5 cm og 5-10 cm med fem replikater (figur 7.2). Her blev jordkernen i hvert spyd skubbet ud, og de to dybder blev adskilt og opsamlet separat. Alle jordprøver blev umiddelbart delt i to, hvor ca. 30 g blev hurtigfrosset i flydende kvælstof og opbevaret på tøris indtil overførsel til -80 °C fryser samme dag. Den resterende jordprøve blev opbevaret ved 4 °C indtil analyse af fysisk-kemiske parametre og ekstracellulær enzymaktivitet.

**Figur 7.2.** Indsamling af prøver under og imellem gyllestreng i 0-5 cm og 5-10 cm dybde.



### 7.2.1 Mikroarthropoder og regnorme

I hvert plot blev der taget tre mikroarthropodprøver (26 cm<sup>2</sup> × 5,5 cm dybde) vha. et jordbor monteret med plexiglascylinder. Prøverne i cylindrene blev dækket med pvc-låg i bund og top og opbevaret ved 5° C til dagen efter. Mikroarthropoder blev uddrevet af prøverne i en modificeret MacFadyen high gradient extractor ved gradvist at øge temperaturen fra 30 til 60 °C. Springhaler blev efterfølgende bestemt til art, og mider til orden eller familie.

Der blev taget to regnormeprøver (delprøver) i hvert parcel. Først blev overjordisk vegetation mv. fjernet med saks fra jordoverfladen, og derefter blev en jordblok på 25 × 25 × 30 cm<sup>3</sup> (l × b × d) gravet op med spade. Den opgravede jordblok blev håndsorteret på stedet, og de fundne regnorme blev overført til plasticpande med lidt fugtig jord inden hjemtransport. I laboratoriet blev ormene bestemt til art vha. nøglen i Sims & Gerard (1999), hvorefter de blev overført til petriskåle med fugtigt træpapir for at tømme tarmen natten over, hvorefter de blev vejjet (voksne og juvenile for sig). For udvalgte prøvers vedkommende blev opgravning og håndsortering af regnorme suppleret med uddrivning vha. sennepssuspension (Singh et al. 2016), som blev hældt i de gravede huller ad op til tre omgange med 15 minutters intervaller. Hvis der ikke kom orme frem ved første tilførsel af sennepssuspension, blev behandlingen ikke gentaget, tilsvarende for anden tilførsel af sennepssuspension. I hver omgang blev der udhældt 1 liter suspension tilsat 10 g sennepspulver. Kun orme, der kravlede helt ud af jorden, blev indsamlet. Idet der kun i en ud af fem prøver blev fanget orme (et individ) ved denne metode, blev den ikke anvendt yderligere på de resterende prøver.

Jordfaunadata blev analyseret statistisk vha. PROC MIXED i SAS ver. 9.4 (SAS Institute Inc. 2023) ud fra modellen:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + X_k + \varepsilon_{ijkl}$$

hvor  $Y_{ijkl}$  er responsvariablen for behandling  $i$ , i plot  $k$  og blok  $l$ ;  $\mu$  er gennemsnittet;  $\tau_i$  er effekten (*fixed*) af behandling  $i$ ;  $\beta_j \sim N(0, \sigma^2_\beta)$  er effekten af blok (tilfældig);  $(\tau\beta)_{ij} \sim N(0, \sigma^2_{\tau\beta})$  er en tilfældig (*random effect*) faktor, der repræsenterer plot-til-plot variationen inden for hver blok (*nested*);  $X_k$  er den kontinuerlige kovariateffekt af jordbundstypen beskrevet ved PC1, den første principale komponent fra en PCA, der opsummerer variationen fra de fem jordbundsegenskaber/tekstur: grovsand, finsand, silt, ler og humus; og  $\varepsilon_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2)$  er residualfejlen (variationen inden for plots).

For at teste forskelle mellem kontrolgruppen og behandlingerne blev Dunnett's test anvendt, da denne metode korrigerer for multiple sammenligninger ved at sammenligne hver behandling individuelt mod kontrolgruppen (SAS Institute Inc. 2023). I enkelte tilfælde blev *contrast*-statement anvendt til specifikke sammenligninger mellem udvalgte behandlinger, fx kontrollen og enten den positive kontrol (PC) eller kunstgødning (CF), for at undersøge præcise effekter uden at justere for multiple test. *Contrast* i PROC MIXED udfører en F-test, hvor hypotesen om, at de specificerede kontraster er lig nul, testes på baggrund af modellens estimater og varianskomponenter.

## 7.2.2 Ekstracellulær enzymaktivitet

Analyse af ekstracellulær enzymaktivitet blev udført som beskrevet i AP3.

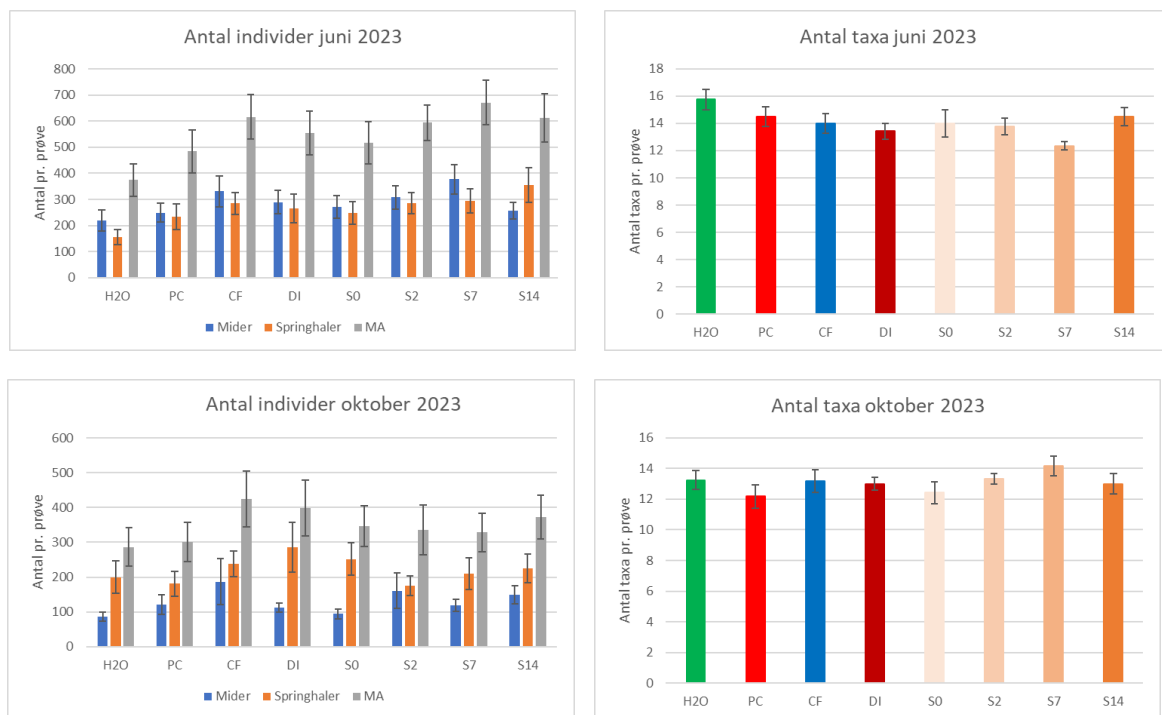
## 7.2.3 Molekylær struktur og diversitet af mikrobiom og invertebrater

RNA blev ekstraheret som beskrevet i AP3, og DNA blev efterfølgende ekstraheret fra samme prøve med et ekstra kit: DNA Set for NucleBond RNA Soil Mini (Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren, Germany) ifølge protokollen. Efterfølgende blev amplikonsekventering af prokaryoter og svampe samt bioinformatik og datanalyse udført som beskrevet i AP3. Desuden blev invertebraters COI-region af mitokondriet amplificeret med primerne mlCO-lintF/jdHCO2198 (Geller et al. 2013) og analyseret som for prokaryoter og svampe. Signifikante forskelle i alfa-diversitet blev bestemt ud fra ANOVA af Shannon diversitetsindeks, mens forskelle i struktur blev analyseret med "permutational analysis of variance" (PERMANOVA). Begge analyser blev analyseret med et signifikansniveau på 5 % ( $p < 0,05$ ).

## 7.3 Resultater

### 7.3.1 Mikroarthropoder og regnorme

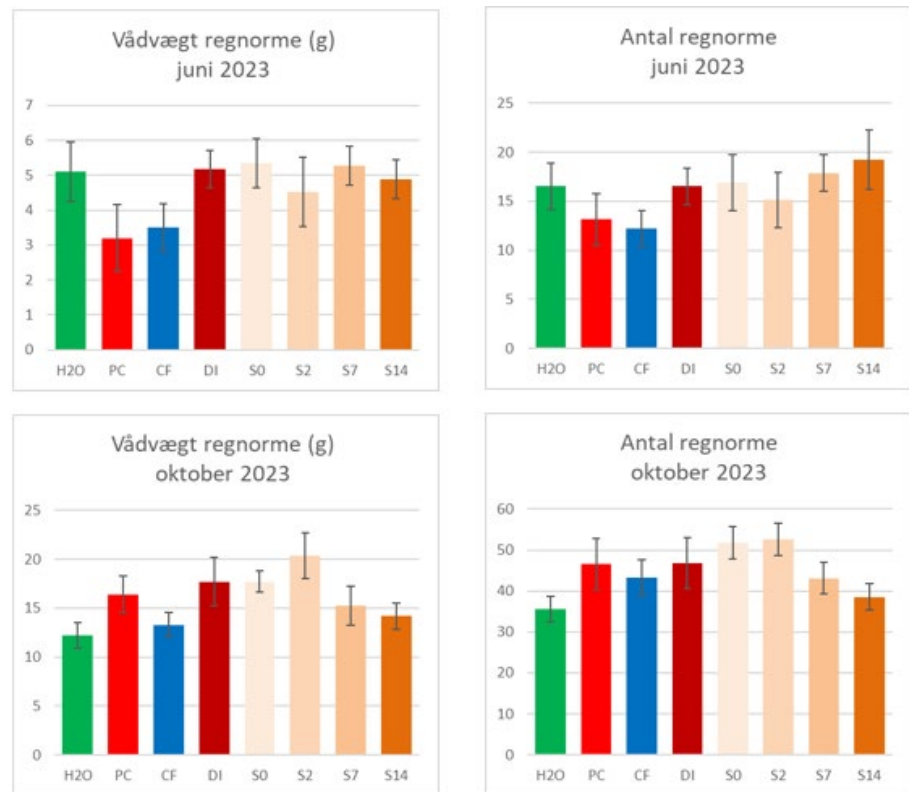
Antal individer og taxa (arter, slægter eller ordener) af mikroarthropoder varierede lidt mellem de to prøvetagninger (figur 7.3) med en tendens til flere dyr i juni end i oktober, mens der for regnormenes vedkommende var betydeligt flere dyr i oktober (figur 7.4).



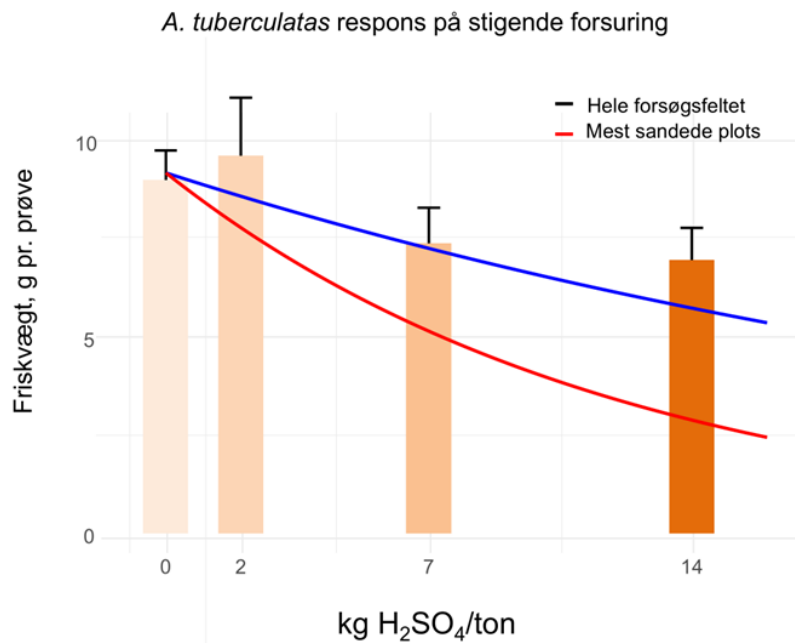
**Figur 7.3.** Antal mider, springhaler og mikroarthropoder (MA) i alt samt antal taxa pr. prøve i juni og oktober 2023, to-tre uger efter udbringning af forsuret gylle. H2O: vandkontrol; PC: positiv kontrol; CF: kunstgødning; DI: gylle nedfældet; S0, S2, S7, S14: gylle udbragt med slange, hhv. uden H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og med 2, 7 eller 14 kg H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> /ton.

Sammenlignet med tilsvarende gylleudbringning uden forsuring blev der ikke fundet signifikante effekter af de forskellige niveauer af gylleforsuring på antallet af springhaler, mider og mikroarthropoder i alt eller antallet af mikroarthropod-taxa i hverken juni eller oktober. Antallet og vådvægten af regnorme var heller ikke signifikant påvirket af forsuringen i juni, mens der var en negativ effekt på op til 25 % af øget forsuring i oktober. Der er generelt ikke observeret effekter af forsuringen på enkeltarter, men i oktober påvirkede jordbundens sammensætning, repræsenteret ved PC1 (baseret på tekstur og humusindhold), følsomheden hos regnormearten *Aporrectodea tuberculata* (stor grå orm) over for forsuring. En GLMM-model (PROC GLIMMIX) blev anvendt til at analysere effekten af syrekonzentration og interaktionen med jordbundsteksturen repræsenteret ved PC1. Højere PC1-værdier (mindre finsand, mere grovsand og humus) øger følsomheden af *A. tuberculata* over for syretilsætning. EC<sub>10</sub> er anslået til ca. 1,5 kg syre/ton for gennemsnitsjordbunden og 3 kg syre/ton for en mere sandet jord fra forsøgsområdet. I den sandede jord anslås EC<sub>50</sub> til 9 kg syre/ton (figur 7.5). Resultatet tyder således på, at jordens tekstur påvirker effekten af gylleforsuring på i hvert fald nogle regnorme. Eventuelle effekter af udbringning af forsuret gylle i mange år i træk kan ikke vurderes ud fra resultaterne fra dette projekt, men kan være relevante at undersøge. Der kan desuden være effekter på enkeltarter af mikroarthropoder, som ikke afdækkes ved analyse af de overordnede data. Se også næste afsnit.

**Figur 7.4.** Antal og vådvægt af regnorme pr. prøve i juni og oktober 2023, to-tre uger efter udbringning af forsuret gylle. H<sub>2</sub>O: vandkontrol; PC: positiv kontrol; CF: kunstgødning; DI: gylle nedfældet; S0, S2, S7, S14: gylle udbragt med slange, hhv. uden H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og med 2, 7 eller 14 kg H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ton.



**Figur 7.5.** Friskvægt af stor grå orm, *A. tuberculata* ( $g/m^2$ ) ved stigende syretilsætning (0, 2, 7 og 14 kg/ton). Søjler viser gennemsnitsværdier med standardfejl (SEM). De eksponentielle kurver viser model estimerede sammenhænge for gennemsnitlig jord PC1 (sort) og høj PC1 (rød) med lavere finsandsindhold, højere grovsandsindhold og humusindhold, hvilket øger følsomheden over for forsuring. EC<sub>10</sub> er anslået til 1,5 kg syre/ton for gennemsnitsjordbunden og 3 kg syre/ton for en mere sandet jord, mens EC<sub>50</sub> i den sandede jord er 9 kg syre/ton.



I juni reducerede den positive kontrol (kun syre) regnormefriskvægten pr. m<sup>2</sup> med 37 % sammenlignet med vandkontrollen (svagt signifikant F-test, P=0.06, PROC MIXED contrast). Effekten var særligt tydelig for lang orm, *Aporrectodea longa*, som udgjorde en tredjedel af den samlede population, og hvis friskvægt faldt signifikant med 72 %. Juvenile orme udgjorde 62 % af regnorme og havde en svagt signifikant nedgang på 41 % i forhold til vandkontrollen (F-test, P=0.07, PROC MIXED contrast).

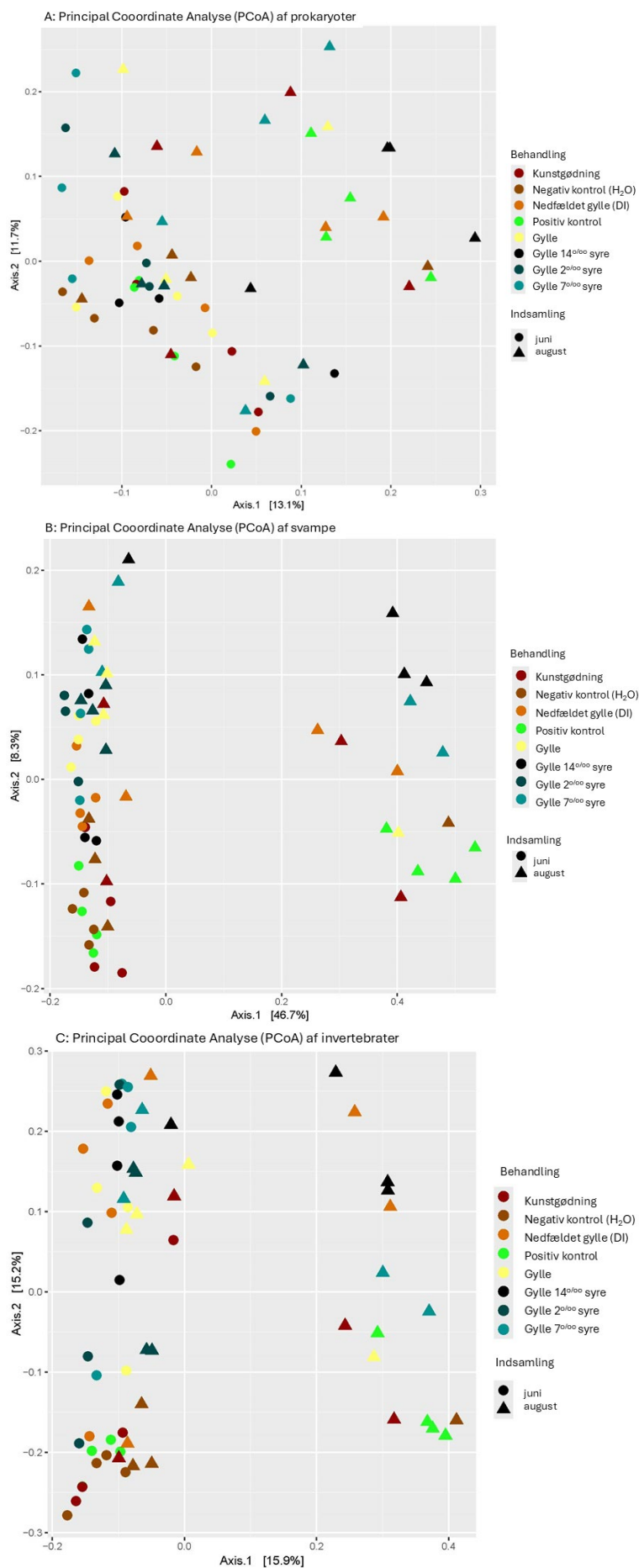
### 7.3.2 Opsummering af effekter på regnorme og mikroarthropoder målt med konventionelle metoder

Anvendelsen af forsuret gylle havde generelt ikke effekter på antallet af springhaler, mider og mikroarthropoder i alt sammenlignet med tilsvarende tilførsel af ikke-forsuret gylle. Antallet og vægten af regnorme var upåvirket af forsuringen efter to tilførsler af forsuret gylle, mens der ved prøvetagningen efter fire udbringninger af forsuret gylle var negative effekter på regnormene. Desuden påvirkede jordens tekstur følsomheden af regnormearten stor grå orm, *A. tuberculata*, over for forsuring. Langsigtede effekter af forsuret gylle anvendt over flere år kan ikke vurderes ud fra resultaterne af dette projekt, men de fundne effekter ved kort tids anvendelse indikerer, at det kan være relevant at undersøge langtidseffekter.

### 7.3.3 Ekstracellulær enzymaktivitet samt invertebraters og mikrobiomets struktur og diversitet

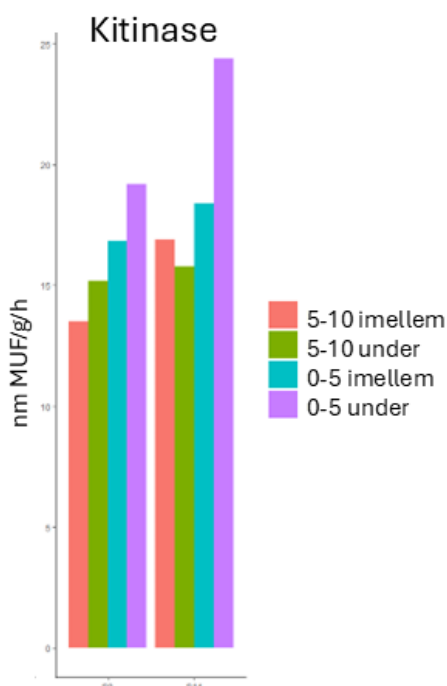
De ekstracellulære enzymer viste generelt signifikant højere aktivitet i august uanset behandling, hvilket sandsynligvis skyldes jordens øgede fugtighed og højere rodbiomasse med en tilhørende højere rodeksudation. Der var ingen signifikante forskelle mellem de forskellige behandlinger med og uden gylle. Alfa-diversiteten af prokaryoter var ikke signifikant påvirket af gylleforsuringen, hverken i juni eller august. Svampenes diversitet var signifikant højere ved gyllebehandling med 0,2 % syre og lavere ved 0,7 % syre sammenlignet med gylle uden syre. For invertebrater var diversiteten signifikant lavere ved gyllebehandling med 0,7 % syre sammenlignet med uforsuret gylle og gylle med 0,2 % syre. Den genetiske (DNA) struktur af prokaryot-, svampe- og invertebratsamfundene var forskellig i juni og august (figur 7.6). For prokaryotsamfundenes struktur blev der ikke fundet forskel mellem behandlinger i hhv. juni og august, mens behandlingerne havde signifikant effekt på svampe og invertebraters samfundsstruktur på begge tidspunkter. Svampes samfundsstruktur var signifikant ændret ved behandlinger med gylle med 0,7 og 1,4 % syre ift. gylle forsuret med 0,2 % syre, mens uforsuret gylle ikke var forskellig fra gylle forsuret med 0,7 og 1,4 %. Specifikke svampeslægter og -familier var forskelligt påvirket af syrebehandlet gylle. Invertebratsamfundenes struktur var signifikant påvirket af gylle forsuret med 1,4 % ift. ingen og 0,2 % forsuring, mens gylle forsuret med 0,7 % ikke var signifikant forskellig fra de andre gyllebehandlinger. Både svampe- og invertebratsamfundenes diversitet var negativt påvirket af gylleforsuringen, mens alle samfundenes struktur ændrede sig. Den længerevarende effekt på især svampe- og invertebratsamfundene ved udbringning af forsuret gylle i flere år kendes ikke.

**Figur 7.6.** Genetisk diversitet af prokaryoter (A), svampe (B) og invertebrater (C) ved de to indsamlinger i hhv. juni og august og de forskellige behandlinger.



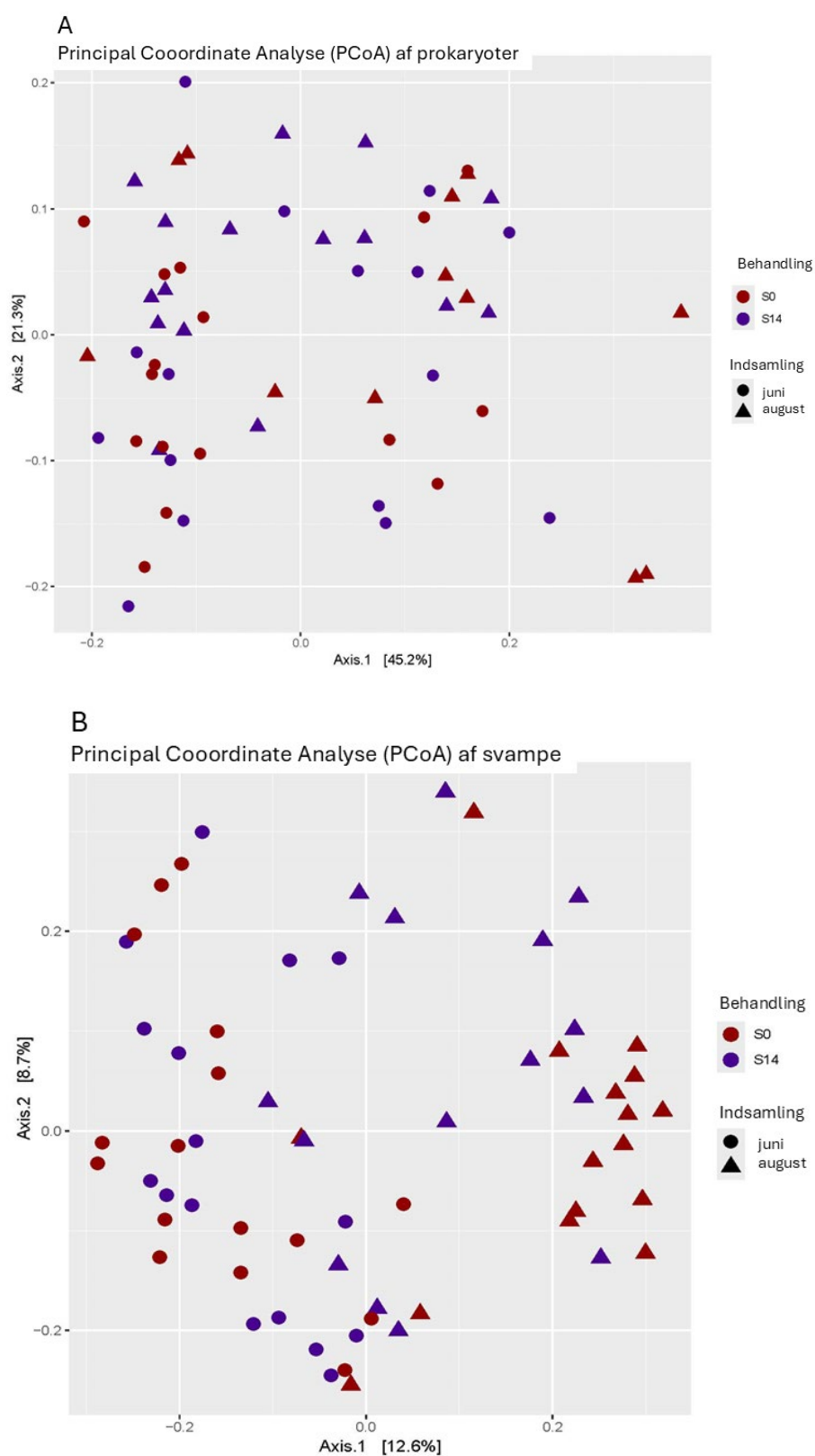
Jordprøver på 0-10 cm udtaget imellem og under gyllesporene ved gylle uden forsuring (S0) og med 1,4 % forsuring (S14) viste signifikant højere ekstracellulær enzymaktivitet 0-5 cm under gyllesporene end imellem gyllesporene, hvilket sandsynligvis kan tilskrives tilførslen af organisk stof med gyllen. Ved prøvetagningen i juni var der ingen effekt af 1,4 % forsuring på enzymaktiviteterne. Ved prøvetagningen i august så vi en signifikant højere aktivitet af kitinase i jorden behandlet med 1,4 % forsuret gylle sammenlignet med ikke forsuret gylle (figur 7.7). Dette kan skyldes ændringer i det tilgængelige organiske materiale, som ved forsuringen kan blive hydrolyseret.

**Figur 7.7.** Ekstracellulær kitinaseaktivitet i august ved S0 og S14 i to dybder (0-5 cm og 5-10 cm) imellem og under gyllestrengen



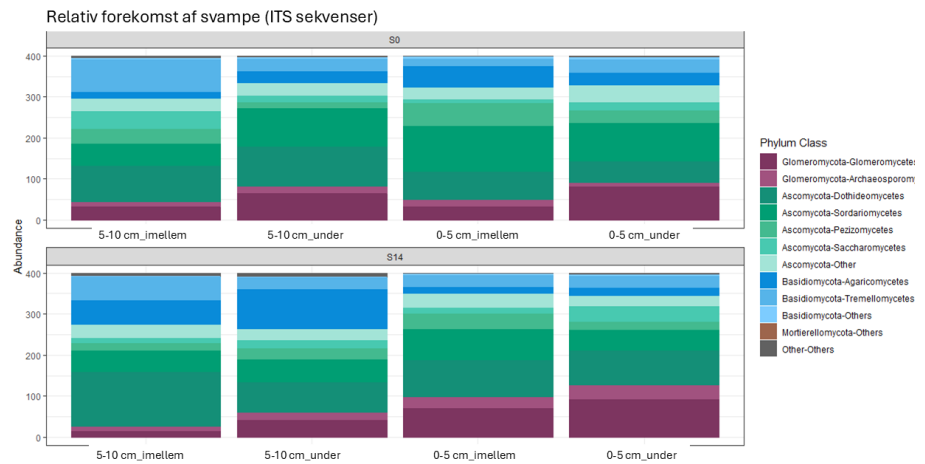
Alfa-diversiteten af de aktive prokaryoter og svampe var ikke signifikant påvirket af gylleforsuringen under og imellem gyllesporene, hverken i juni eller august. Ved indsamling 14 dage efter gylleudbringning i juni var der ingen effekt på svampe og prokaryotsamfundenes struktur målt ved amplikonsekventering af hhv. aktive ITS og 16S rRNA gener. I august, syv dage efter gylleudbringning, var prokaryoters samfundsstruktur signifikant påvirket af behandling med uforsuret versus 1,4 % forsuret gylle. Udelukkende svampesamfundene var forskellig imellem og under gyllestrengen (figur 7.8). Ligesom i jordsøjleforsøget ændredes den relative forekomst af arbuskulære mykorrhiza-svampe (fx Glomeromycota) under gyllestrengen og mest ved gyllebehandlingen med 1,4 % forsuret gylle (S14), hvilket kan indikere ændringer i denne følsomme svampegruppe (figur 7.9).

**Figur 7.8.** Genetisk samfundsstruktur af aktive prokaryoter og svampe under og imellem gyllestrenger ved gyllebehandlinger uden (S0) og med 1,4% syre (S14).





**Figur 7.9.** Relativ forekomst af svampe imellem og under gyllestrengen ved behandling med gylle (S0) og gylle forsuret med 1,4 % syre (S14) syv dage efter gylleudbringning i august.



### 7.3.4 Opsummering af effekter på ekstracellulær enzymaktivitet samt invertebraters og mikrobiomets struktur og diversitet

Påvirkning af jordens sundhed ved tilførsel af gylle forsuret op til 1,4 % med svovlsyre er beskrevet i markforsøg. Jordens sundhed blev beskrevet ved ekstracellulær enzymaktivitet samt jordens mikrobielle diversitet og struktur med både eRNA- og eDNA-teknikker. Gylletilførslen påvirkede de mikrobiologiske parametre, primært tæt på gyllen, dvs. under gyllestrengen, hvor der var en effekt på nogle enzymaktiviteter. Her er specielt den stimulerende effekt på kitinase bemærkelsesværdigt, da kitinaseaktivitet kan relateres til svampebiomasse.

I markforsøgets syv forskellige behandlinger var der ingen effekt på den ekstracellulære enzymaktivitet, mens svampe- og invertebratsamfundenes diversitet var faldende, og strukturen var påvirket af gyllebehandlinger med stigende forsurening. Der var indikationer på effekter på mykorrhizasvampe, som er en følsom svampegruppe. Eventuelle effekter ved langvarig og gentagen udbringning af forsuret gylle kan ikke vurderes ud fra resultaterne fra dette projekt.

## 8 Referencer

Andersen, M.N., Adamsen, A.P., Lærke, P.E., Larsen, S.U., Jørgensen, U., Olesen, J.E., Manevski, K., Bay, S.S., Hutchings, N.J., Hansen, E.M., Munkholm, L.J., Børgesen, C.D., Thomsen, I.K., Elsgaard, L., Petersen, S.O., Toda, M., Ntinyari, W., Sørensen, P., Audet, J., Krogh, P.H., Bruus, M., Blicher-Mathiesen, G., Kronvang, B., Zak, D., Andersen, T.A., Albrektsen, R., Gyldenkerne, S., Callisen, L.W., Mikkelsen, M.H., Winding, A., Sapkota, R., Dalby, F.R., Kai, P., Jensen, M., Nørremark, M., Børsting, C.F., Lund, P., Kjeldsen, M.H., Maigaard, M., Amorim Franchi, G., Jensen, M.B., Villumsen, T.M., Hansen, M.J., Kristensen, H.L., Nørgaard, J.V., Bouquet, A., Buitenhuis, A. & Nielsen, H.M. 2024. Virkemidler til reduktion af klimagasser i landbruget - 2024. Rådgivningsrapport fra DCA - Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Aarhus Universitet. 375 sider. Leveret: 10.06.2024

Buivydaitė, Ž., Lilja, M.A., Sapkota, R., Winding Hansen, B., Ellegaard-Jensen, E., Hendriksen, N.B., Krogh, P.H. & Winding, A. (2023?). Earthworms shape prokaryotic communities and affect extracellular enzyme activities in agricultural soil. *European Journal of Soil Biology* 115: 103474. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2023.103474>.

Christiansen, N.G., Iturbe-Espinoza, P., Sapkota, R. & Winding, A. (2025). Data curation of extracellular enzyme activity spectrophotometric or fluorometric data. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=5138167> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.5138167>.

Cosby, B.J., Hornberger, G.M., Clapp, R.B. & Ginn, T.R. (1984). A Statistical Exploration of the relationships of soil moisture characteristics to the physical properties of soils. *Water Resources Research* 20: 682-690. <https://doi.org/10.1029/WR020i006p00682>

Fangueiro, D., Hjorth, M. & Gioelli, F. (2015). Acidification of animal slurry - a review, *Journal of Environmental Management* 149: 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.10.001>

Feilberg, A., Kamp, J.N., Lemes Perschke, Y.M. & Nyord, T. (2021). Notat om lagerforsuring af gylle og effekt på emissioner af NH<sub>3</sub> og CH<sub>4</sub> målt i fuld skala ved hjælp af online spektroskopi og spredningsmodellering. <https://dcapub.au.dk/djfpublikation/index.asp?action=show&id=1515>

Hansen, S., Jensen, H.E., Nielsen N.E. & Svendsen, S. (1990). DAISY - soil plant atmosphere system model. Tech. rep. A10. Miljøstyrelsen.

Hansen, S. (2002). Daisy, a flexible Soil-Plant-Atmosphere system Model. Web page: <https://code.google.com/archive/p/daisy-model/wikis/DaisyDescription.wiki>

Hargreaves, G.H. & Allen, R.G. (2003). History and evaluation of Hargreaves Evapotranspiration Equation. *Journal of Irrigation & Drainage Engineering* 129: 53. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9437\(2003\)129:1\(53\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9437(2003)129:1(53))

Hargreaves, G.H. & Samani, Z.A. (1985). Reference crop evapotranspiration from temperature. *Applied Engineering in Agriculture* 1: 96–99. <https://doi.org/10.13031/2013.26773>

Hendriksen N.B., Creamer R.E., Stone D. & Winding, A. (2016) Soil exo-enzyme activities across Europe-The influence of climate, land-use and soil properties. *Applied Soil Ecology* 97: 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.012>

Ihrmark, K. Ihrmark, I.T.M., Bödeker, K., Cruz-Martinez, H., Friberg, A., Kurbartova, J., Schenck, Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K.E. ., & Lindahl, B.D. (2021). New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* 82: 666–677. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x>

Jensen, J., Krogh, P.H., Sørensen, P. & Petersen, S.O. (2018). Potentielle miljøeffekter ved anvendelse af forsuret gylle på landbrugsjord. DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi. Videnskabelig rapport fra DCE- Nationalt Center for Miljø og Energi Nr. 257, <http://dce2.au.dk/pub/SR257.pdf>

Kronvang, B., Jeppesen, E., Conley, D.J., Søndergaard, M., Larsen, S.E., Ovesen, N.B. & Carstensen, J. (2005). Nutrient pressures and ecological responses to nutrient loading reductions in Danish streams, lakes and coastal waters. *Journal of Hydrology* 304(1-4): 274–288.

Meng, X., Ma, C. & Petersen, S.O. (2022). Sensitive control of N<sub>2</sub>O emissions and microbial community dynamics by organic fertilizer and soil interactions. *Biology and Fertility of Soils* 58: 771–788. <https://doi.org/10.1007/s00374-022-01662-9>

Muys, B. & Granval, P. (1997). Earthworms as bio-indicators of forest site quality. *Soil Biology and Biochemistry* 29(3–4): 323–328, [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00047-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00047-8).

SAS Institute Inc. (2023). SAS/STAT® 15.3 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Sims, R.W. & Gerard, B.M., 1999. Earthworms: Notes for the identification of British species. No. 31 (Revised). Linnean Society of London and the Estuarine and Coastal Sciences Association. FSC Publications.

Singh, J., Singh, S. & Vig, A.P. (2016). Extraction of earthworm from soil by different sampling methods: a review. *Environment Development and Sustainability* 18: 1521–1539. [10.1007/s10668-015-9703-5](https://doi.org/10.1007/s10668-015-9703-5).

Spurgeon, D.J., Lofts, S., Hankard, P.K., Toal, M., McLellan, D., Fishwick, S. & Svendsen, C. (2006), Effect of pH on metal speciation and resulting metal uptake and toxicity for earthworms†. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 788–796. <https://doi.org/10.1897/05-045R1.1>

Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T. & Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. *PLOS ONE* 9(8): e105592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105592>

Vejen, F., Vedel, H. & Scharling, M. (2021). Korrektion af observeret nedbør i Danmark. DMI-rapport 21-39.  
[https://www.dmi.dk/fileadmin/Rapporter/2021/DMI\\_21-39 -  
\\_Korrektion\\_af\\_observeret\\_nedboer\\_i\\_Danmark.pdf](https://www.dmi.dk/fileadmin/Rapporter/2021/DMI_21-39_-_Korrektion_af_observeret_nedboer_i_Danmark.pdf)

Wösten, J.H.M., Lilly, A., Nemes, A. & Le Bas, C. (1998). Using existing soil data to derive hydraulic parameters for simulation models in environmental studies and in land use planning. Final Report of the European Union Funded Project., Report 156, DLOstaring Centre, Wageningen.

Zak, D., Hupfer, M., Cabezas, A., Jurasinski, G., Audet, J., Kleeberg, A., McInnes, R., Kristiansen, S. M., Petersen, R. J., Liu, H. & Goldhammer, T. (2021). Sulphate in freshwater ecosystems: A review of sources, biogeo-chemical cycles, ecotoxicological effects and bioremediation. *Earth-Science Reviews* 212: Article 103446. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2020.103446>

Zak, D., Rossoll, T., Exner, H.-J., Wagner, C. & Gelbrecht, J. (2009). Mitigation of sulfate pollution by re-wetting of fens – a conflict with restoring their phosphorus sink function? *Wetlands* 29: 1093–1103.

## MILJØKONSEKVENSER AF GØDSKNING MED FORSURET GYLLE

Projektet undersøgte effekten af forsuret kvæggylle på udvaskning af sulfat, fosfat og jordbundssundhed i kløvergræsmarker. Øget svovlsyreindhold førte til øget udvaskning af sulfat, mens effekterne på fosfat og tungmetaller var minimale. Forsuret gylle påvirkede ikke væsentligt mikroarthropoder, men ændrede jordens enzymaktivitet og mikroorganismer, især ved høj forsuring. Regnorme blev ikke påvirket efter to påføringer, men viste negative effekter efter fire. Langtidseffekter af forsuring er ikke vurderet, men kortsigtede resultater indikerer behov for yderligere undersøgelser.