# OVER DE AFBRAAK VAN $Ca$-CYAANAMIDE IN DEN GROND

J. TEMME

N08201.134

Dit proefschrift met stellingen van

JOHANNES TEMME

Landbouwkundig Ingenieur, geboren te Coevorden den 15en Augustus 1914, is goedgekeurd door den promotor DR JAN SMIT, hoogleeraar in de microbiologie.

De Rector Magnificus der Landbouwhoogeschool
S. C. J. OLIVIER

Wageningen, 14 Januari 1946

# OVER DE AFBRAAK VAN CA-CYAANAMIDE IN DEN GROND

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN

DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE

OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS, DR IR S. C. J. OLIVIER, HOOGLEERAAR IN DE SCHEIKUNDE, TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN VAN EEN COMMISSIE UIT DEN SENAAT DER LANDBOUWHOOGESCHOOL TE WAGENINGEN OP DONDERDAG 7 FEBRUARI 1946 TE 15 UUR DOOR

J. TEMME

H. VEENMAN & ZONEN · WAGENINGEN · 1946

*Aan de nagedachtenis van mijn Vader*

*Aan mijn Moeder*

*Aan mijn Vrouw*

# STELLINGEN

## I

De opvatting van SCHMALFUSZ, als zouden de micro-organismen in den grond de voornaamste rol spelen bij de omzetting van cyaanamide in ureum, is onjuist.

Bodenk. u. Pfl.ern., *54–55* (1938): 273
WIENHUES: Bodenk. u. Pfl.ern., *66–67* (1940): 417
Deze dissertatie

## II

Het in de werkingssfeer van een chemisch-actief oppervlak in ureum omgezette cyaanamide reageert aldaar in den vorm van de carbo-di-iminoverbinding $\left(C\begin{matrix}=N-H\\=N-H\end{matrix}\right)$ en niet als het amide van cyaan $(N \equiv C - NH_2)$.

TAUSS: Handbuch der Pflanzenernährung (HONCAMP) II: 516 (1931)
WERNER: Journ. Chem. Soc. (London) *107* (1915): 715
Deze dissertatie

## III

Het materiaal dat het chemisch-actieve oppervlak levert, is van minder belang voor de physisch-chemisch gekatalyseerde omzetting van cyaanamide tot ureum dan de gesteldheid van dat actieve oppervlak en wel in het bijzonder de verhouding van waterstof: basen van de aan het oppervlak geadsorbeerde kationen.

KAPPEN: Habilitationsarbeit (1913), Jena
SMOCK: Ohio Agr. Exp. Stat. 555 (1935)
Deze dissertatie

## IV

Onder gemiddeld-normale klimatologische omstandigheden is dicyaandiamidevorming uit Ca-cyaanamide, bij bemesting met kalkstikstof, niet te vreezen, indien de gronden in een goeden cultuurtoestand verkeeren.

Deze dissertatie

## V

In den Tuinbouw zal kalkstikstof een zeer bruikbare stikstof-meststof blijken te zijn. Als warmte-leverend materiaal in z.g.n. „koude" broeibakken zal een stroomest, bereid met kalkstikstof, zeer goed paardemest kunnen vervangen.

MANTEL en GIESECKE: Bodenk. u. Pfl.ern. *64* (1940): 253

## VI

Dat sommige plantenziekten bestreden kunnen worden met kalkstikstof berust op de verbetering van de structuur van den grond en op den giftigen invloed van het cyaanamide op sommige schimmels en bacteriën.

BOENING: Phyt. Ztschr. *6* (1933): 113
HONCAMP: Handb. d. Pfl.ern. (1931) II: 876

## VII

De omzetting van elementaire stikstof in hoogere stikstofverbindingen komt bij Azotobacter en Rhizobium op dezelfde wijze tot stand.

WILSON c.s.: Biochem. J. *32* (1938): 2084
WYSS en WILSON: Nat. Acad. Sci. *27* (1941): 162

## VIII

Een internationale commissie zal, met het oog op de centrale positie van het fosforzuur in de huishouding van de levende wezens, voor een rationeele verdeeling van het wereldfosforzuurkapitaal zorg moeten dragen.

## IX

In Nederland dient een economische Landbouwkundige Voorlichtingsdienst gesticht te worden, welke ten nauwste moet samenwerken met den, reeds bestaanden, bedrijfs-technischen Voorlichtingsdienst.

## X

Het onderwijs aan de Landbouwhoogeschool in de zuivelbereiding en de melkkunde voor de studierichting $L^I$ voldoet niet aan practische eischen, omdat de noodzakelijke leerstof in het ter beschikking staande aantal lesuren niet voldoende behandeld kan worden.

Bij het verschijnen van mijn proefschrift gevoel ik behoefte allen, hoogleeraren, docenten en assisteerend personeel, die tot mijn landbouwvorming hebben bijgedragen, te bedanken. Allereerst mijn dank aan U, Hooggeleerde SMIT, dat U mij in de gelegenheid hebt gesteld, na het beëindigen van de studie aan de Landbouwhoogeschool, een wetenschappelijk onderzoek te verrichten. Al heeft U, door de omstandigheden gedwongen, niet zooveel leiding aan het onderzoek kunnen geven als gebruikelijk is, toch is Uw critiek voor mij van veel nut geweest. Ik was zeer verheugd over het feit, dat U het manuscript van mijn dissertatie in zoo korten tijd hebt willen corrigeeren en van Uw fiat hebt willen voorzien. Ook naar U, Hooggeleerde TENDELOO, gaat mijn dank uit voor de prettige gesprekken, die ik met U mocht hebben, wanneer mijn onderzoekingen het noodzakelijk maakten Uw hulp in te roepen.

Zeergeleerde WIERINGA. Nog lang zal ik mij den tijd herinneren, dien ik doorbracht als assistent aan het Laboratorium voor Microbiologie. Niet alleen door de prettige samenwerking bij het onderwijs, doch ook door Uw kameraadschappelijke, opbouwende critiek bij het onderzoek, die altijd stimuleerend werkte. Ook in moeilijke oogenblikken is Uw steun voor mij van groote beteekenis geweest.

Zeergeleerde SCHUFFELEN, ook de door U geleverde critiek is voor mij van veel waarde geweest. De geanimeerde gedachtenwisselingen over onderdeelen van mijn werk en de door U betoonde interesse in de uitkomsten van mijn experimenten, zal ik niet makkelijk vergeten. Dat U, Zeergeleerde Mej. LÖHNIS, bereid was, in zoo korten tijd de Summary te verzorgen, wordt door mij zeer op prijs gesteld.

Dat het onderzoek in den geprojecteerden omvang mogelijk was, is te danken aan den Heer C. H. VAN DEN HOUTEN, directeur van de N.V. „Electro" te Amsterdam, die, door middel van het Landbouwkundig Bureau der Nederlandsche stikstofmeststoffen-Industrie (directeur de Heer C. BOUDEWIJN) te Den Haag, het onderzoek financieel steunde. Het uitgeven van een proefschrift was echter niet mogelijk geweest zonder de opofferingen, die mijn vrouw zich in de achter ons liggende jaren getroost heeft.

Veel steun ondervond ik van Mej. J. M. LIST, die als analyste vele van de benoodigde chemische en bacteriologische werkzaamheden met enthousiasme heeft verricht. Bij enkele proeven kon ik beschikken over de medewerking van de Heeren B. ROELOFSEN en J. P. H. VAN DER WANT, die beiden voor hun ingenieursstudie op het Laboratorium voor Microbiologie werkzaam waren.

Verder richt ik een woord van dank tot de Heeren C. VAN DE WEERT en CH. VAN HEELSBERGEN, die respectievelijk de aquarel tegenover blz. 70 en de grafieken verzorgden.

De taalkundige verzorging van manuscript en drukproeven was in handen van den Heer G. HAKSTEGE, particulier corrector, te Wageningen.

Tenslotte wil ik het personeel van het Laboratorium voor Microbiologie bedanken voor hun prettige hulp.

# INHOUD

Blz.

Inleiding . . . . . I

HOOFDSTUK I

Historische groei van de inzichten in de omzettingen van Ca-cyaanamide in den grond. Probleemstelling . . . . . 3

HOOFDSTUK II

Methode van onderzoek . . . . . 9
§ 1. Algemeene beschouwingen . . . . . 9
§ 2. Proefopzet . . . . . 10
§ 3. De bij de proeven gebezigde cyaanamide-hoeveelheden . . . . 11
§ 4. Het gereedmaken van de monsters voor de chemische analyses 12
§ 5. Keuze van percolatievloeistof . . . . . 13

HOOFDSTUK III

Veranderingen en afbraak van Ca-cyaanamide in normalen en verhitten grond . . . . . 14
§ 1. Afbraak in normalen grond . . . . . 14
§ 2. Veranderingen in verhitten grond — de invloed hierop uitgeoefend door het actieve materiaal . . . . . 16

HOOFDSTUK IV

Nadere beschouwingen over de krachten, die de omzettingen van het cyaanamide in den grond bepalen.. . . . . 27
§ 1. De invloed van de kationen-bezetting van het actieve oppervlak 27
§ 2. Het chemisme van de omzettingen . . . . . 39
§ 3. Critische beschouwingen over enkele misvattingen omtrent de omzettingen en afbraak van cyaanamide in den grond . . . . 44

HOOFDSTUK V

Gedrag van micro-organismen uit den grond t.o.v. cyaanamide . . 48
§ 1. De vorming van ureum uit cyaanamide door verschillende micro-organismen . . . . . 48
§ 2. Enkele literatuurgegevens over den invloed van kalkstikstof op het bacteriënleven in den grond . . . . . 56

## Hoofdstuk VI

Blz.

De nitrificatie van Ca-cyaanamide . . . . . 59
§ 1. Afbraak van het uit cyaanamide gevormde ureum . . . . . 59
§ 2. Nitrificatie van cyaanamide in waterige oplossing . . . . . 60
§ 3. Enkele factoren, die de nitrificatie van kalkstikstof beïnvloeden 63
§ 4. De invloed van dicyaandiamide op de nitrificatie en op den plantengroei . . . . . 68

## Hoofdstuk VII

Enkele aspecten van het kalkstikstofvraagstuk in den landbouw . 72

Samenvatting . . . . . 87

Summary . . . . . 91

Literatuurlijst . . . . . 95

# INLEIDING

Kalkstikstof wordt in den Nederlandschen landbouw meestal gebruikt als onkruidbestrijdingsmiddel. De werking van kalkstikstof als stikstofmeststof wordt dan beschouwd als „extraatje". Het gebruik als zoodanig is beperkt tot enkele gevallen, waarbij het toegepast wordt als voorjaarsbemesting bij gewassen met een langdurige groeiperiode.

Als onkruidbestrijdingsmiddel bij wintergranen wordt het ongeveer in Februari uitgestrooid, bij voorkeur over dauwnat gewas, wanneer een droge dag kan worden verwacht. Het onkruid wordt in het nog jonge groeistadium verbrand, terwijl de (meestal) geringe schade aan het graangewas vrij spoedig weer ingehaald is, waartoe in niet geringe mate de met kalkstikstof aan den grond toegediende stikstof het zijne bijdraagt.

Al naar den stand van het gewas na den winter, den bemestingstoestand van den grond en de klimatologische omstandigheden kan de met kalkstikstof toegediende stikstof een gunstigen of ongunstigen (legeren door teveel N) invloed op het gewas hebben.

Tenslotte verandert kalkstikstof door haar hooge Ca-gehalte (in CaO uitgedrukt: 60–65 %) den reactietoestand, algemeen gezegd de Ca/H-verhouding in den grond, hetgeen weer met zich brengt een wijziging in de kationenbezetting van het adsorptiecomplex.

Maakt men studie van het zeer groote aantal literatuurgegevens van onderzoekingen over en in verband met kalkstikstof, dan stuit men op zooveel onduidelijkheden en tegenspraken, dat een goed gefundeerd inzicht in de gunstige en/of ongunstige eigenschappen van deze meststof, met betrekking tot de hier genoemde drieledige werking, moeilijk te krijgen is. Het duidelijkst valt dit op bij de vaststelling van de waarde van kalkstikstof als N-meststof.

Het N-leverende bestanddeel is het Ca-cyaanamide, dat gekenmerkt is door het feit, dat het als zoodanig niet door de plant kan worden opgenomen. Het moet dus, in den grond gebracht, verschillende omzettingen ondergaan vóór de erin vervatte N de plant ten goede kan komen.

Een volledige kennis van deze omzettingen is een eerste vereischte, vóór men zich met kans op succes, door middel van veldproeven, een idee kan vormen over de waarde van kalkstikstof als N-meststof.

Uit het volgende zal blijken, dat de beschikbare literatuur over deze omzettingen te weinig definitiefs weet mee te deelen, zelfs zóó, dat o.a. GIESECKE en SCHMALFUSZ in 1936 konden schrijven: „...Die Kalkstickstoffrage bedürft noch eine genaue bodenbiologische Prüfung" (20).

Ook de beschikbare proefveldgegevens laten geen definitieve beoordeeling toe, omdat ze voor een groot gedeelte verkregen zijn n.a.v. proeven, die op te kleine schaal werden opgezet en van te weinig gegevens voorzien gepubliceerd werden, terwijl ze elkaar tenslotte meermalen volkomen tegenspreken.

De omvang der gestelde problemen maakte een degelijke experimenteele bewerking van het geheele in deze inleiding genoemde gebied van het kalkstikstofgebruik in den ons ten dienste staanden tijd onmogelijk. Daarom hebben we ons bij onze onderzoekingen moeten beperken tot de meer theoretische basis van het probleem, nl. tot de vragen:

„welke zijn de omzettingen, die het Ca-cyaanamide in den grond ondergaat en welke zijn, in verband met deze omzettingen, de verwachtingen over de waarde als N-meststof voor verschillende gronden?"

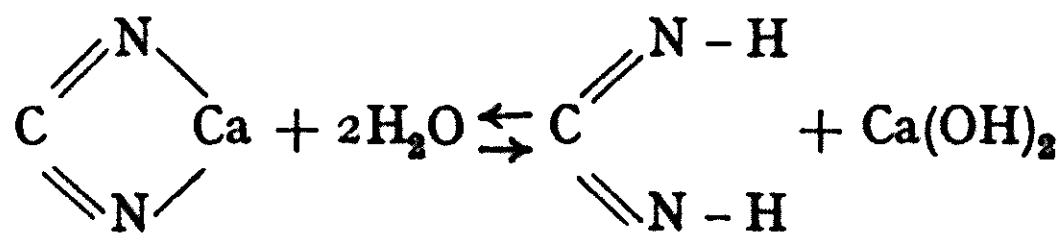
Met de hierna beschreven onderzoekingen, die gedeeltelijk opgezet werden met de bijbedoeling, de resultaten van verschillende andere onderzoekers goed te kunnen beoordeelen en te controleeren, is getracht een bijdrage te leveren tot het vinden van een antwoord op de hierboven gestelde vragen.

## HOOFDSTUK I

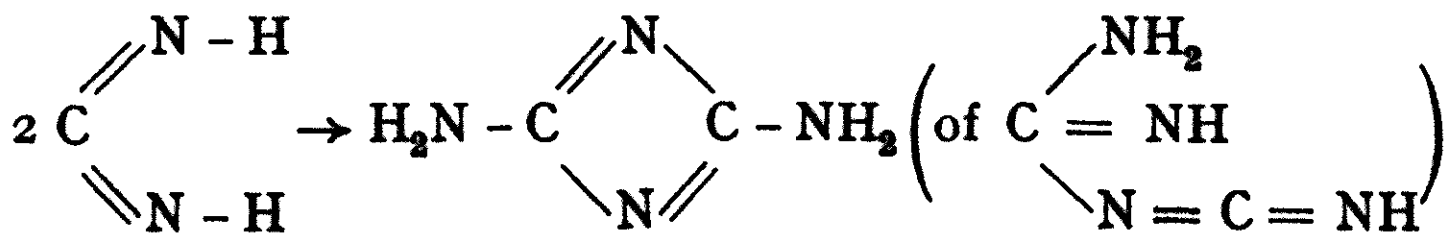
# HISTORISCHE GROEI VAN DE INZICHTEN IN DE OMZETTINGEN VAN Ca-CYAANAMIDE IN DEN GROND

Sedert GERLACH en WAGNER (18) gevonden hadden, dat kalkstikstof goed als N-meststof is te gebruiken, volgde een reeks onderzoekingen, die licht moesten werpen op de manier, waarop haar N-houdende component, het Ca-cyaanamide, in den grond afgebroken wordt tot de voor de plant opneembare $NH_4$- en $NO_3$-ionen.

In waterige oplossing ontstaat uit Ca-cyaanamide, cyaanamide en calciumhydroxyde, volgens:



In de alcalische, verwarmde oplossing polymeriseert het cyaanamide gemakkelijk in dicyaandiamide, volgens:



In den grond wordt het cyaanamide echter veranderd in ureum. Alle, eventueel uit het cyaanamide gevormde verbindingen zouden, volgens oudere literatuurgegevens, in den grond afgebroken worden tot ammoniak en verder omgezet worden in nitraat. Over de manier, waarop ammoniak uit Ca-cyaanamide ontstaat, liepen de meeningen uiteen.

IMMENDORFF (27) vermoedde, dat de omzetting van het Ca-cyaanamide tot ammoniumcarbonaat in den grond tot stand komt volgens de eenvoudige vergelijking:

$$CN_2Ca + CO_2 + 4H_2O = (NH_4)_2CO_3 + CaCO_3.$$

BEHRENS (6) maakte echter aannemelijk, dat uit het Ca-cyaanamide in den grond op dezelfde wijze ammoniak gevormd zou worden als dat bij ureum het geval is nl. door bacteriologische invloeden. De bacteriologische afbraak van cyaanamide tot ammoniak kwam hiermee in het centrum van de belangstelling te staan.

LÖHNIS c.s. (43, 44) meenen ook, dat de afbraak het werk is van micro-

organismen. D.m.v. proeven in cultuurvloeistoffen werd aangetoond, dat inderdaad door micro-organismen uit grond ammoniak gevormd wordt uit Ca-cyaanamide. Dit werd bevestigd door PEROTTI (57) en ASHBY (3). Laatstgenoemde onderzoeker entte b.v. verschen grond in een vloeistof, die naast verschillende zouten, 0,1 % „Kalkstickstoff" en 0,1 % glucose (als C-bron) bevatte. In dit mengsel kon na eenigen tijd ammoniak aangetoond worden, terwijl de ammoniakvorming in de partieel gesteriliseerde of met sublimaat behandelde kolven zoo goed als geheel uitbleef.

Onderzoekingen van ULPIANI (81) leidden aanvankelijk tot de opvatting, dat alleen het door polymerisatie van vrij cyaanamide ontstane dicyaandiamide door bacteriën aangetast kon worden. Het cyaanamide zou als bacteriegif nagenoeg niet door micro-organismen in ammoniumcarbonaat kunnen worden omgezet.

Na een uitgebreidere studie komt ULPIANI (82, 83) echter tot de beter gefundeerde conclusie, dat het Ca-cyaanamide in den grond langs zuiver chemischen weg omgezet wordt als volgt:

1. een snel verloopende omzetting van cyaanamide in ureum;
2. een langzaam tot stand komende omzetting van cyaanamide in dicyaandiamide.

Beide processen zouden zonder de medewerking van micro-organismen tot stand komen. Bacterieele invloeden grijpen het ontstaande ureum en dicyaandiamide aan. Ureum wordt hierbij door de ureumsplitsende micro-organismen in ammoniumcarbonaat veranderd, het dicyaandiamide kan volgens ULPIANI op twee manieren tot ammoniak afgebroken worden, nl. via amidocyaanzuur en dicyaandiamidine. PEROTTI (58) bevestigde het feit, dat dicyaandiamide door micro-organismen tot ammoniak afgebroken kan worden.

De aandacht van ULPIANI was gevestigd op het ureum en dicyaandiamide als omzettingsproducten van het cyaanamide, doordat BAUMANN (5) in 1873 al had aangetoond, dat genoemde verbindingen bij chemische manipulaties met cyaanamide als reactieproducten optraden.

In dit stadium ontwikkelt zich een strijd tusschen ULPIANI en LÖHNIS over de al of niet giftigheid van cyaanamide voor micro-organismen uit den grond, hetgeen neerkomt op een strijd tusschen de aanhangers van de theorie van directe ammonificatie van het cyaanamide (LÖHNIS e.a.) en die onderzoekers, die vóór de eigenlijke ammonificatie door micro-organismen een inleidende, zuiver chemische, omzetting van cyaanamide tot ureum (en dicyaandiamide) veronderstellen: ULPIANI en later ook KAPPEN.

Langzamerhand wint de laatste zienswijze meer terrein (waarbij nu ook LÖHNIS (45) zich kon aansluiten), vooral nadat ULPIANI (84) en

daarna KAPPEN (30, 31) ± 1910–1913 verder aannemelijk maken, dat de cyaanamide-afbraak in den grond ingeleid wordt met een chemische omzetting van cyaanamide in ureum en/of dicyaandiamide. ULPIANI geeft als katalysatoren voor de eerstgenoemde omzetting aan de anorganische colloïdale bestanddeelen van den grond. KAPPEN noemt de hydrogelen $Mn(OH)_2$, $Fe(OH)_3$ etc. de meest werkzame katalysatoren in dezen.

STUTZER en REIS (78) kwamen ongeveer tot dezelfde conclusies als ULPIANI en KAPPEN, alhoewel deze onderzoekers de medewerking van micro-organismen bij de directe omzetting van het cyaanamide in ammoniak niet geheel uitsluiten. ± 1913 staat men dus algemeen op het standpunt, *dat in den grond de ureumvorming uit cyaanamide een physisch-chemisch proces is, dat onafhankelijk van de medewerking van micro-organismen tot stand komt. Bepaalde anorganische katalysatoren* (waarvan met name de hydroxyden van Mn en Fe genoemd worden) *zouden deze omzetting bewerkstelligen.*

Deze opvatting kan worden samengevat in de volgende drie onderdeelen:

1. $CN_2Ca + 2H_2O = CN_2H_2 + Ca(OH)_2$;
2. $CN_2H_2 + H_2O = CO(NH_2)_2$;
3. $CO(NH_2)_2 + 2H_2O = (NH_4)CO_3$.

In de samenvattingen van lateren datum wordt de medewerking van micro-organismen bij de ureumvorming uit cyaanamide echter niet geheel uitgesloten (16).

Het zoojuist ontwikkelde inzicht in de cyaanamideomzetting en -afbraak in den grond is tot ± 1938 in de literatuur onveranderd blijven bestaan, hoewel dit het resultaat is van proefnemingen, die genomen werden onder omstandigheden, die niet vergeleken kunnen worden met het gebeuren in den grond. Zoo werd o.m. gewerkt met grondentingen in cultuurvloeistoffen; verder bezigde men cyaanamideconcentraties, die soms 10–100 maal zoo hoog waren als de bij de bemesting van grond met kalkstikstof mogelijk optredende. Ook de verdere voorwaarden waaronder de omzettingsproeven genomen werden (hooge temperaturen, koken van cyaanamidehoudende vloeistoffen met sterk zuur of sterke loog) laten een klakkeloos overbrengen van de ermee bereikte resultaten op den grond niet toe.

Dat het inzicht in de omzettingen van het Ca-cyaanamide in den grond van 1910–1913 niet bevredigde moge blijken uit een opmerking van KAPPEN: „Die Zyanamidzersetzung ist jetzt weiter als je davon entfernt endgültig geklärt zu sein" (30).

Ook ons kan de tot nu toe gevolgde wijze van werken niet bevredigen, omdat zij niet overeenstemt met het in de laatste 20–30 jaar verbeterde inzicht in de werking, beter gezegd samenwerking, der verschillende

krachten in den grond, waarbij men hun onderlinge verhoudingen beter heeft leeren beseffen.

Moeten de onderzoekingen in deze materie tot ± 1914 dus met een zekere reserve verwerkt worden, anders is het met de resultaten van de na 1920 met kalkstikstof werkende onderzoekers, zooals COWIE e.a. COWIE (11, 12) voerde zijn omzettingsproeven uit met den grond zélf als medium; bovendien „bemest" hij zijn grond met kalkstikstofhoeveelheden, die overeenkomen met de in de landbouwpractijk gebruikelijke. Hij komt langs dezen weg echter tot dezelfde conclusies als ULPIANI en KAPPEN, al laat hij zich niet zoo duidelijk uit over de krachten, die de omzetting van cyaanamide in ureum veroorzaken.

Inmiddels hebben MAZÉ en LEMOIGNE (50), zij het ook op niet zeer overtuigende wijze, bewezen, dat bepaalde micro-organismen in staat zijn uit cyaanamide, mits in voldoend lage concentraties gegeven, ureum te maken. In 1924 onderwerpen JACOB, ALLISON en BRAHAM (28) het probleem, welke omzettingsproducten uit het Ca-cyaanamide in den grond ontstaan, nog eens aan een uitgebreid onderzoek, zonder echter een afdoend antwoord te kunnen geven op welke wijze ureum uit cyaanamide gevormd wordt. Vooraf komen HETHERINGTON en BRAHAM (24) tot belangrijke uitspraken over „de hydrolyse en polymerisatie van cyaanamide in zure en alkalische milieu's". In tegenstelling met de oudere onderzoekers, die òf het gevormde ureum niet aantoonden òf dit wel deden doch met onnauwkeurige methodes, houden HETHERINGTON en BRAHAM rekening met het feit, dat, wanneer ureum uit cyaanamide gevormd wordt, dit alleen is te bewijzen met het aantoonen van het gevormde ureum. Het constateeren van een verdwijning van het cyaanamide alléén zegt natuurlijk niets over de ontstane omzettingsproducten. Met een speciaal voor dit doel gewijzigde methode, uitgewerkt door FOX en GELDARD (15) wordt ureum bepaald. Dicyaandiamide wordt bepaald uit het verschil:

$$(\text{totaal-N}) - (\text{cyaanamide-N} + \text{ureum-N}) = \text{dicyaandiamide-N}.$$

De uit dit onderzoek getrokken conclusies luiden:

1. Cyaanamide wordt in zwavelzure oplossing bij 50 °C kwantitatief en zéér snel tot ureum gehydrolyseerd. De hydrolyse wordt gekatalyseerd door de $H^+$-ionen.
2. In alkalische oplossing (NaOH) wordt het cyaanamide bij 50 °C gedeeltelijk gehydrolyseerd tot ureum, gedeeltelijk gepolymeriseerd tot dicyaandiamide. Hydrolyse is hier waarschijnlijk het gevolg van de $OH'$-ionen.

In de geheele literatuur over kalkstikstof wordt de angst voor dicyaandiamide-vorming min of meer duidelijk naar voren gebracht, in verband

met de schade voor de plant en voor de nitrificeerende organismen in den grond. Het is dus van belang te weten òf en wanneer dicyaandiamidevorming uit cyaanamide in den grond kan optreden. Daar het in dit verband niet zoo veel zegt, dat in een milieu van 0,1 of 1 N NaOH dicyaandiamide-vorming plaats heeft, onderzochten BUCHANAN en BARSKY (9) de omzetting van cyaanamide in oplossingen van bepaalde pH. Uit dit onderzoek bleek, dat in vloeistoffen met een pH $< 7$ geen gevaar bestaat voor dicyaandiamidevorming. Deze begint bij pH 7–8 en neemt boven pH 8 snel in intensiteit toe.

Aangezien echter in een cultuurgrond een pH $> 8$ tot de zeldzaamheden behoort, zal een dicyaandiamidevorming bij bemesting van den normalen grond met kalkstikstof niet gevreesd behoeven te worden.

Wanneer SCHMALFUSZ (71) in 1938 de literatuurgegevens over de afbraak van cyaanamide in den grond aan een critische beschouwing onderwerpt komt hij tot de conclusie, dat dit probleem allerminst geheel is opgelost. Hij is van meening, dat de nu reeds $\pm$ 25 jaar voor juist geldende opvatting omtrent de cyaanamide-afbraak niet voldoende verantwoord is, in het bijzonder wat de inleidende omzetting tot ureum betreft. „Die herrschende Anschauung vom Abbau des Zyanamids im Boden ist experimentell keineswegs so unterbaut wie es den Anschein haben könnte. Zumindest musz es als wahrscheinlich gelten dasz es auch Mikroorganismen gibt, die in der Lage sind, direkt das Zyanamid anzugreifen und abzubauen, während die heute verbreitete Auffassung die Fähigkeit der Mikroorganismen erst beim katalytisch gebildeten Harnstoff ansetzen lässt."

SCHMALFUSZ bevestigt dan na proefnemingen met vloeistofcultures met voldoend lage cyaanamide concentraties de vondst van MAZÉ en LEMOIGNE (zie voren), dat er micro-organismen zijn, die ureum uit cyaanamide kunnen maken. De schimmel *Aspergillus niger* blijkt in dezen zeer actief te zijn. SCHMALFUSZ komt ten slotte tot de conclusie, dat de bacteriën en schimmels in den grond de voornaamste rol spelen bij de omzetting van cyaanamide in ureum. Wanneer aan de (ook door SCHMALFUSZ niet ontkende) physisch-chemische ureumvorming al eenige waarde moet worden toegeschreven, dan is deze volgens den genoemden auteur toch van ondergeschikt belang. Men zal in dit geschrift zien, dat ons deze conclusie veel te ver gaat en niet voldoende gesteund wordt door het experiment.

In tegenstelling met deze, nogal revolutionnaire, zienswijze van SCHMALFUSZ verdedigt ROTINI (70) weer het physisch-chemische standpunt van ULPIANI, KAPPEN en COWIE. Bij dezen strijd SCHMALFUSZ-ROTINI kan aangeteekend worden, dat eerstgenoemde werkte met cyaanamideconcentraties, overeenkomend met die welke in den grond zullen optreden bij

practisch bruikbare kalkstikstofgiften. ROTINI daarentegen voerde zijn proeven uit met veel hoogere cyaanamideconcentraties, die voor microorganismen zeer giftig zijn. Mogelijkerwijs is deze concentratiekwestie van invloed geweest op de door beide onderzoekers uit hun proefnemingen getrokken conclusies.

Uit het zoojuist geschrevene blijkt duidelijk, dat het na critische bestudeering van de resultaten der verschillende onderzoekers niet goed mogelijk is zich een juist denkbeeld te vormen over het probleem van de inleidende omzettingen van het cyaanamide tot ureum en/of dicyaandiamide. Veeleer zal een eigen onderzoek de elkaar gedeeltelijk tegensprekende literatuurgegevens moeten aanvullen.

Uit het voorgaande kunnen we verschillende vragen destilleeren. Daar in de literatuur een controverse bestaat tusschen hen, die een physisch-chemische en hen, die een biochemische ureumvorming aannemen, moet allereerst getracht worden uit te maken, of er in den grond ureum ontstaat uit cyaanamide langs één der genoemde wegen. Ook is het mogelijk, dat beide omzettingen in den grond naast elkaar bestaan. Verder is het van belang te weten of in den grond een directe (biochemische) ammonificatie van het Ca-cyaanamide bestaat.

Tenslotte dient nagegaan te worden óf, en zoo ja onder welke omstandigheden, er in den grond dicyaandiamidevorming uit cyaanamide mogelijk is.

De oplossing van deze problemen is van groot belang voor de vraag naar de waarde van kalkstikstof als N-meststof voor verschillende gronden, in verband met heerschende klimaatsomstandigheden.

## HOOFDSTUK II

# METHODE VAN ONDERZOEK

### § 1. *Algemeene beschouwingen*

De in het vorige hoofdstuk ontwikkelde probleemstelling vraagt dus het kunnen scheiden van de *physisch-chemische-* en de *biochemische krachten* in den grond. Hiertoe moeten we het in dit onderzoek gebruikte omzettingsmedium, grond, aan een zoodanige behandeling onderwerpen, dat één dezer krachten tijdelijk uitgeschakeld kan worden. Er zal dus, aangezien dit alleen maar mogelijk is met de biochemische krachten, gewerkt moeten worden, eenerzijds met niet-verhitten, anderzijds met verhitten grond. Vergelijking der uitkomsten van de omzettingsproeven in beide soorten grond geeft uitsluitsel over de wijze waarop de hydrolyse van cyaanamide tot ureum in den grond tot stand komt. Uit een voor-onderzoek dienaangaande bleek echter, dat het niet eenvoudig is grond door verhitting steriel te krijgen. Bovendien heeft de grond door deze behandeling zulke ingrijpende veranderingen ondergaan, dat weliswaar de microflora zoo goed als geheel uitgeschakeld is, doch meteen verschillende onbekende factoren ingevoerd zijn. Bijvoorbeeld blijken de humusbestanddeelen sterk afgebroken te worden.

Om tot een practisch uitvoerbare methode van werken te geraken kan men uitgaan van de volgende gedachten.

Allereerst kan men de te onderzoeken omzettingen trachten na te bootsen in een medium, dat gemakkelijk steriel gemaakt kan worden en dat samengesteld wordt uit bestanddeelen, die eigenschappen hebben vergelijkbaar met die van de samenstellende deelen van den natuurlijken cultuurgrond. Gedacht wordt hierbij aan mengsels van:

1. *kwartszand*, het geraamte van den grond imiteerend·
2. *adsorbeerend materiaal*, b.v.:
   natuurlijke kleifracties,
   kleimineralen als kaoliniet etc.,
   norit,
   dusarit,
   permutit e.d.;
3. *humuspreparaten*;
4. *colloidale sesquioxyden*

Mengsels van deze vier bestanddeelen kunnen ons den physisch-chemischen omzettingsfactor op het spoor brengen.

Tenslotte kan als completeerende factor ingevoerd worden:

5. *de grond-microflora.*

Door gebruik te maken van bepaalde micro-organismen en/of -groepen zal men in staat zijn alles te weten te komen omtrent het biochemische gedeelte van de omzettingen van de te onderzoeken verbindingen.

Bij de tweede zienswijze gaan we uit van den natuurlijken grond als omzettingsmedium. Zooals zonder meer duidelijk is dient de kennis van den gang van zaken in den natuurlijken grond vooraf te gaan aan het onderzoek met den zoojuist veronderstelden „kunstgrond". De kennis van het gebeuren in den grond kan met de resultaten van de proeven met de kunstmatige mengsels aangevuld worden, als inderdaad blijkt, dat de aangebrachte krachtbronnen een werking hebben die vergelijkbaar is met de overeenkomstige in den cultuurgrond.

We hebben ons dan ook voor het grootste gedeelte tot de tweede methode moeten beperken, dus het werken met den natuurlijken grond als omzettingsmedium.

T.a.v. het uitschakelen van de biochemische krachten in den grond moesten we nagaan of absolute steriliteit van het medium wel een vereischte was. Uit het weergegevene in hoofdstuk III zal blijken, dat in verband met het oriënteerende van ons onderzoek volstaan kan worden met een verhitting van den, tot $\pm$ 50 % van haar watercapaciteit bevochtigden, grond gedurende 2 $\times$ 20 min. op 115 °C. Tusschen beide behandelingen bleef de grond 48 uur staan bij kamertemperatuur. In enkele gevallen werd gebruik gemaakt van grond, die 2 $\times$ ½ uur of 2 $\times$ 1 uur op 100 °C gestoomd was.

## § 2. *Proefopzet*

Een bepaalde hoeveelheid Ca-cyaanamide (zie § 3) werd, al dan niet gesteriliseerd, toegevoegd aan 100 gram van den gebezigden grond, die zich bevond óf in kleine bekerglazen afgedekt met een petrischaal óf in erlenmeyers afgesloten met een wattenprop, wanneer gewerkt werd met „verhitten" grond.

Er moest voor gezorgd worden, dat bij proeven van langeren duur (nitrificatieproeven b.v.) het vochtgehalte van den grond binnen bepaalde grenzen constant gehouden werd. Hiertoe werden de proefpotjes gezamenlijk in een glazen aquariumbak geplaatst, waarin een weinig water + desinfectiemiddel gebracht waren. De glazen bak werd afgedekt met een glazen plaat en in het donker bij de gewenschte temperatuur weggezet. Op deze manier werden ongewenschte verdampingen tegengegaan.

Bij het volgen van de omzettingen van Ca-cyaanamide gingen we zóó te werk, dat na elken gewenschten tijd een bepaald aantal grondmonsters van 100 gram geanalyseerd werden. Dit analyseeren van het geheele monster heeft het voordeel, dat dan van de geheele hoeveelheid cyaanamide de omzetting nagegaan wordt. Eventueel te maken analysefouten worden dan niet grooter dan strikt noodzakelijk is, terwijl het nadeel van ongelijke verdeeling van het cyaanamide in den grond geen invloed op het eindresultaat kan hebben. Dit is wel het geval indien men voor elke analyse een monster uit een grootere hoeveelheid moet nemen.

## § 3. *De bij de proeven gebezigde cyaanamidehoeveelheden*

Aangezien cyaanamide voor hoogere planten en micro-organismen een gif is, kan men zich voorstellen, dat een eventueele bacterieele omzetting van het cyaanamide alleen mogelijk is in een oplossing met een zeer lage cyaanamideconcentratie.

SCHMALFUSZ gebruikte met het oog hierop (en met het oog op door hem gevreesde instabiliteit van het cyaanamide bij hoogere concentraties) bij zijn proeven een waterige cyaanamideoplossing, die niet meer dan ± 30 mg N per 100 cc bevatte. Het bleek, dat deze concentratie door de micro-organismen uit den grond nog zeer goed verdragen werd. Dit kon ook door ons bevestigd worden.

We zullen dus, om ons bij de landbouwpractijk aan te kunnen sluiten, bij onze omzettingsproeven rekening moeten houden met de in den grond bereikte cyaanamideconcentratie, wanneer de grond met een bepaalde hoeveelheid kalkstikstof per ha bemest wordt. Naast de berekening van de hoeveelheid per 100 g grond is het duidelijk, dat niet meer dan een ruwe schatting mogelijk is van de in de waterphase bereikte concentraties Fig. 1 geeft het verband aan tusschen hoeveelheid cyaanamide-N per ha en die per 100 g grond (62).

Neemt men met RATHSACK als waarde voor het gemiddelde volume-gewicht van grond 1,5 aan, dan komt 1 mg N per 100 g grond overeen met 1,5 kg N per ha bij een vermengingsdiepte van 1 cm.

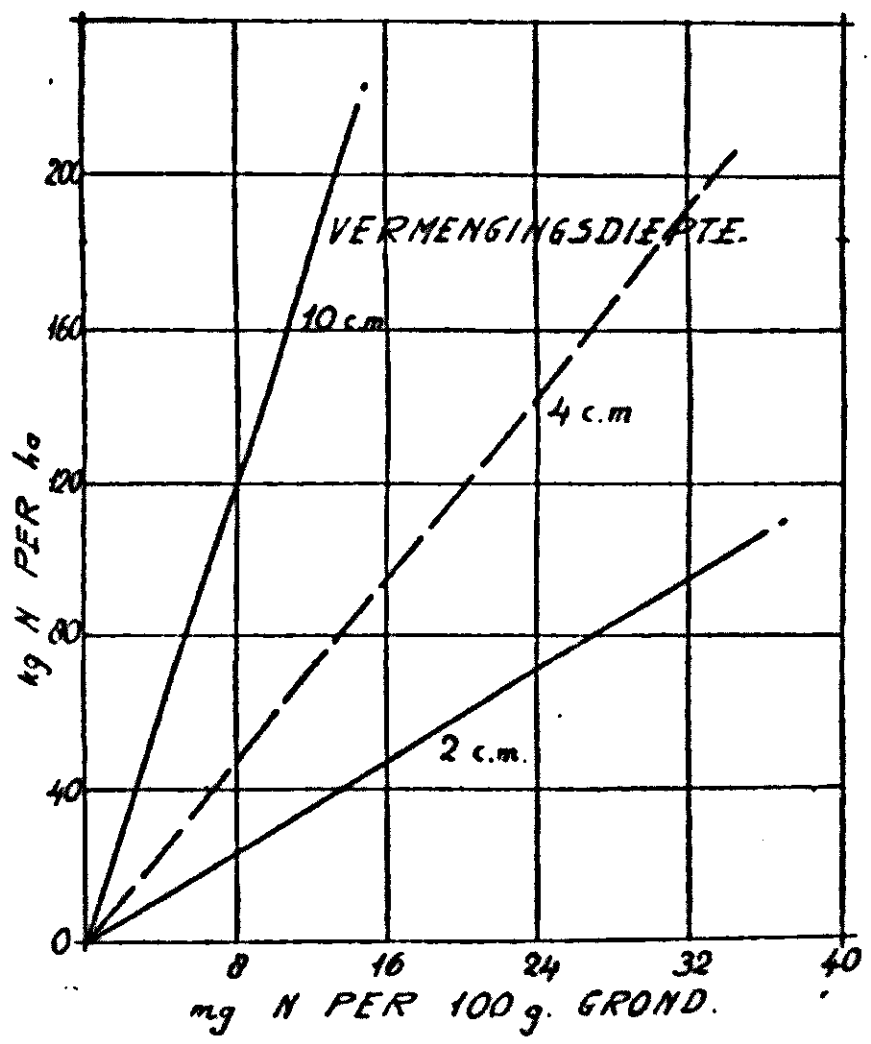



Fig. 1. Het verband tusschen hoeveelheid N-mest per ha en die per 100 g grond (naar RATHSACK (62))

Mét RATHSACK gingen we uit van een vermengingsdiepte van 4 cm, overeenkomend met de gemiddelde werkdiepte van een eg. In fig. 1 is de gestreepte lijn een maat voor een vermengingsdiepte van 4 cm.

Bij onze proeven bezigden wij concentraties van 10–15 mg cyaanamide-N per 100 g grond. Dit komt dus overeen met een bemesting in de practijk van ± 60–90 kg N per ha.

De concentratieverhoudingen worden echter anders, wanneer men niet de hoeveelheid N per 100 g grond berekent, doch de hoeveelheid per eenheid grondwater, uitgaande van de mate van verzadiging van den grond met water op het moment van bemesting. De door ons gebruikte grond (L 32) heeft een watercapaciteit van 32 %. Wanneer we weten, dat bij de proeven de grond altijd gebracht werd op ± 50–60 % van haar watercapaciteit, dan leert een korte berekening, dat de concentratie in de waterphase van den grond bedroeg 0,06–0,1 %.

Om steeds onderling vergelijkbare resultaten te krijgen verdiende het aanbeveling om het Ca-cyaanamide in waterige oplossing aan den grond (of cultuurvloeistof) toe te voegen; een oplossing waarvan het gehalte nauwkeurig bekend is. Deze cyaanamideoplossingen werden als volgt gemaakt:

5 g kalkstikstof werden gedurende ¾–1 uur in een schudmachine geextraheerd in een kolf (1 liter inhoud) met 400 of 900 cc water. Na het extraheeren werd snel afgefiltreerd en de overmaat kalk met $CO_2$ neergeslagen. Het doorleiden van $CO_2$ werd beëindigd wanneer de pH van het kalkstikstofextract ongeveer 7 geworden was. Als indicator werd broom-thymolblauw gebruikt. Na affiltreeren van het gevormde $CaCO_3$ werd dan het extract aangevuld tot een bepaald volume (500 of 1000 cc). Hierna was het extract voor het gebruik gereed, nadat, indien noodig, bepaald waren het totaal-N-, cyaanamide- en ureum-gehalte. Het verschil (totaal-N)–(cyaanamide-N + ureum-N) gaf dan het waarschijnlijke dicyaandiamidegehalte. De aldus bereide extracten bevatten nooit ammoniak.

### § 4. *Het gereedmaken van de monsters voor de chemische analyse*

Na den vereischten proefduur moesten de grondmonsters, resp. cultuurvloeistoffen, op cyaanamide en/of haar omzettingsproducten onderzocht worden.

#### *a. Proeven met grond*

De grond werd uit het bekerglas (of erlenmeyer) in een porceleinen schaal gestort en gemengd met een ongeveer gelijk volume kwartszand (Leerdam), waarna het mengsel gebracht werd in een percolatiebuis. Onder in deze buis bevindt zich een prop glaswol, waarop een laagje kwartszand. Nadat alle grond + kwartszand in de buis geschept is, wordt het mengsel door kloppen tegen de buis iets samengepakt. Dit dient om

kanalen in den buisinhoud te vermijden. Hierna wordt het grond-kwartszandmengsel afgedekt met een dun laagje kwartszand, waarop nog een prop glaswol gelegd wordt. We voeren nu, b.v. met behulp van een maatkolf, een bepaalde hoeveelheid percolatievloeistof door de grondmengselzuil. De snelheid van doorvloeiïng is te regelen met een klemkraan, die onderaan de buis op een afvoerslang is aangebracht.

Door deze percolatie worden de zich in den grond bevindende reactieproducten vollediger en sneller afgevoerd dan het geval is bij schudden van den grond met een bepaalde hoeveelheid uitwaschvloeistof.

Nadat een bepaalde hoeveelheid (meestal 500 cc) percolaat verkregen is wordt de uitwassching beëindigd, waarna in dit percolaat de chemische bepalingen uitgevoerd kunnen worden.

*b. Proeven met cultuurvloeistoffen*

Deze vloeistoffen worden na bepaalden omzettingstijd afgefiltreerd. Al naar de te verrichten chemische analyse wordt gefiltreerd door een membraanfilter of filtreerpapier. Ook het filtreeren met een Chamberlandkaars gaf op een snelle manier volkomen heldere filtraten, die voor cyaanamide-bepalingen een vereischte zijn. Voor ureum- en ammoniakbepaling kan men volstaan met het filtraat verkregen door middel van papier.

## § 5. *Keuze van percolatievloeistof*

Wanneer men de grondmonsters uitwaschte met water zouden troebele percolaten verkregen worden, doordat veel humus- en kleibestanddeelen meegespoeld worden. Het percoleeren moet, ter verkrijging van heldere oplossingen, geschieden met waterige oplossingen die, de colloïdale grondbestanddeelen uitvlokkende, kationen bevatten. Hiervoor kunnen dienst doen het $H^+$-, $K^+$-, $Ca^{++}$-, $Ba^{++}$-ion. Omdat bij onze onderzoekingen het gebruik van een neutraal zout vereischt was, viel de keus op het $K^+$-ion. Het in het zout meegevoerde anion bleek echter eveneens van groote beteekenis te zijn. Een oplossing van KCl was b.v. niet bruikbaar, omdat het $Cl^-$-ion storend werkt bij de cyaanamide- en nitraatbepaling. Het gebruik van kaliumsulfaat en -nitraat kwam het meeste in aanmerking. $K_2SO_4$ werd gebruikt wanneer in de percolaten naast ureum en ammoniak ook nitraat bepaald moest worden. $KNO_3$ werd gebruikt wanneer in de percolaten cyaanamide, ureum en ammoniak bepaald werden.

Bij ons onderzoek werden dan ook oplossingen van $\frac{N}{2}$ $K_2SO_4$ en van $\frac{N}{2}$ $KNO_3$ als percolatievloeistof gebezigd.

De analyse-methodiek, die voor de kwantitatieve bepaling der verschillende N-verbindingen gebruikt werd, wordt beschreven aan het einde van deze dissertatie (zie blz. 81).

## HOOFDSTUK III

# VERANDERING EN AFBRAAK VAN Ca-CYAANAMIDE IN NORMALEN EN VERHITTEN GROND

### § 1. *Afbraak in normalen grond*

Als uitgangspunt voor verder onderzoek nemen we de omzetting en afbraak die Ca-cyaanamide in onveranderden grond ondergaat.

We voegen, om dit na te gaan, een bepaalde hoeveelheid kalkstikstof-extract toe aan den zandgrond (L 32) uit den tuin van het Laboratorium voor Microbiologie [1]), die met water op 50–60 % van haar watercapaciteit is gebracht. Hierna gaan we den grond, die weggezet wordt bij 23 °C, van tijd tot tijd op cyaanamide-, ureum- en ammoniakgehalte analyseeren.

*Proef* 1

Porties van 100 g grond (L 32), pH: 6,2.
Toegevoegd 10 cc kalkstikstof-extract bevattend:
10,4 mg cyaanamide-N,
0,9 mg ureum-N.
Grond gebracht op 50–60 % van de watercapaciteit.
Omzettingstemperatuur 23 °C.
In percolaten bepaald:
cyaanamide-N,
ureum-N,
ammoniak-N.
Resultaten in tabel 1, fig. 2.

Beschouwing van tabel 1 en fig. 2 leert ons, dat het cyaanamide gelijkmatig verdwijnt met den duur van de proef. Als tusschenproduct bij deze verdwijning treedt ureum op. Dit wordt echter niet noemenswaard opgehoopt, omdat het onmiddellijk omgezet wordt in ammoniumcarbo-

---

[1]) *Zandgrond L 32*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Watercapaciteit | 32 % | *) „humus" | 4 % |
| *) $pH_{(H_2O)}$ | 5,9 % | *) fractie 16–2 $\mu$ | 4 % |
| *) $pH_{(KCl)}$ | 4,9 % | *) fractie $< 2\ \mu$ | 5 % |

*) Analyses: Rijkslandbouwproefstation en Bodemkundig Instituut te Groningen.

TABEL 1 *De afbraak van cyaanamide in zandgrond (L 32)*

| Analyses na | Aantal geanal. monsters | N in mg per 100 mg grond | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Cyaanam.-N | Ureum-N | Ammoniak-N |
| 0 h . . . . . | 3 | 10,3 | 0,9 | 0,0 |
| 6 h . . . . . | 3 | 8,5 | 1,0 | 0,0 |
| 12 h . . . . . | 5 | 7,2 | 1,2 | 2,9 |
| 24 h . . . . . | 5 | 5,2 | 1,4 | 3,6 |
| 36 h . . . . . | 5 | 2,3 | 2,3 | 6,7 |
| 48 h . . . . . | 3 | 2,0 | 2,0 | 6,0 |
| 60 h . . . . . | 2 | sp. | 0,9 | 7,8 |
| 72 h . . . . . | 1 | sp. | 0,5 | 8,8 |
| 108 h . . . . . | 1 | 0,0 | 0,0 | 9,6 |

naat. We kunnen een top in de ureumcurve waarnemen na 36–40 uur: de vorming van ureum overheerscht tot dat moment nog eenigszins de omzetting ervan in ammoniumcarbonaat. Na een omzettingstijd van ongeveer 40 uur gaat evenwel de afbraak de vorming overheerschen.

De ammoniaklijn spreekt voor zichzelf en behoeft geen nadere toelichting.

De grafiek als geheel beschouwd doet ons zien, dat het zich in oplossing bevindende Ca-cyaanamide in de hier gebezigde concentratie na ± 100–110 uur staan bij 23 °C in grond vrijwel geheel in ammoniak is omgezet. Tevens blijkt, dat de opmerking van WIENHUES (87), dat „door de buitengewoon snelle ammonificatie van ureum geen ureumvorming uit cyaanamide zou zijn aan te toonen", niet heelemaal juist is. Wanneer men den grond, bemest met Ca-cyaanamide (of kalkstikstof), maar na voldoende korte tijdsintervallen op ureum onderzoekt is ureumvorming wèl aan te toonen.

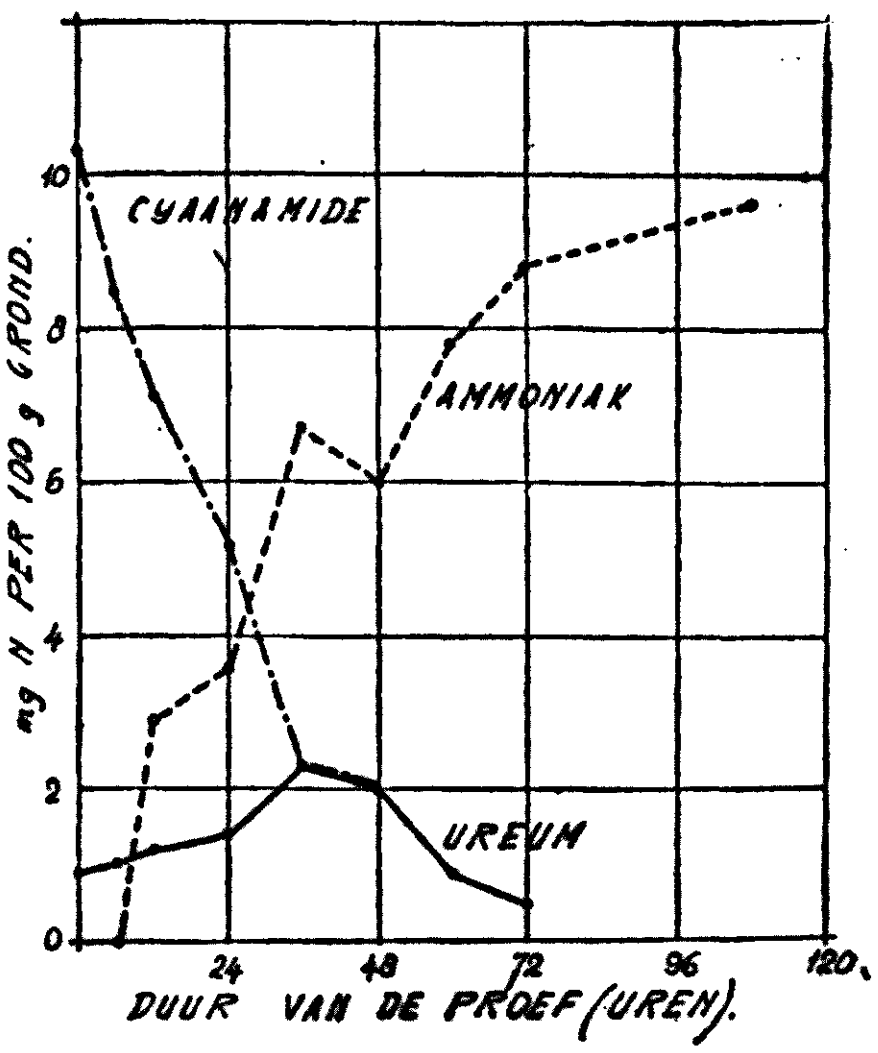



Fig. 2. Het verband tusschen tijd en afbraak van cyaanamide in zandgrond bij 23 °C

Het verdwijnen van cyaanamide in „levenden" grond is geheel in overeenstemming met hetgeen dienaangaande gevonden werd door CROWTHER en RICHARDSON (13).

De snelheid waarmee het cyaanamide in den grond omgezet wordt, blijkt samen te hangen met het vochtgehalte van den grond en de

temperatuur waarbij de omzetting plaats heeft. Wanneer de grond 19% water bevatte, kwam de omzetting in het onderzochte geval iets langzamer tot stand dan wanneer het watergehalte 11% bedroeg. Verder verdween het cyaanamide bij 22,5 °C iets sneller dan bij 13,5 °C. Bij een watergehalte van den grond van 11% en een temperatuur van 22,5 °C was 10 mg cyaanamide-N per 100 g grond na ruim 60 uur geheel omgezet.

De lijn, die het verdwijnen van cyaanamide aangeeft, blijkt te voldoen aan de formule van een monomoleculaire reactie:

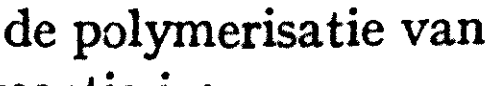
$$e_{log} \frac{100}{x} = M. \frac{t}{w},$$

waarin x = het percentage cyaanamide dat na t uur nog over is in den grond, die een vochtgehalte w heeft. M heeft bij bepaalde temperatuur een bepaalde waarde

Dit wijst op een monomoleculaire homogene reactie; ongetwijfeld komt de reactie tot stand overeenkomstig de vergelijking van de tweede orde:

$$H_2CN_2 + H_2O = CO(NH_2)_2,$$

die zich echter zal gedragen als een pseudo-monomoleculaire reactie, aangezien de oplossingen zóó verdund zijn, dat de concentraties van een der reageerende bestanddeelen (water) in overmaat aanwezig is t.o.v. de andere. Aangezien de polymerisatie van cyaanamide tot dicyaandiamide een bimoleculaire reactie is:



$$2H_2CN_2 = (H_2CN_2)_2$$

volgt uit het door CROWTHER en RICHARDSON meegedeelde meteen, dat voor dicyaandiamide-vorming uit cyaanamide in den grond onder de aangehouden voorwaarden geen plaats is. Ook PRANKE (60) merkt al op, dat „in good agricultural practice very little if any dicyanodiamide is formed in the soil".

## § 2. *Verandering in „verhitten" grond*

Nu vastgesteld is dat ureum ontstaat bij de cyaanamideafbraak, vragen we ons af op welke wijze deze hydrolyse tot stand komt. Ze vertoont op het eerste gezicht veel overeenkomst met die van ureum tot ammoniumcarbonaat. Het veronderstellen van een gemeenschappelijke hydrolyseerende kracht in den grond is dus wel begrijpelijk. Alhoewel in de literatuur de physisch-chemische hydrolyse van cyaanamide tot ureum het meest op den voorgrond staat, moeten we dus voorloopig nog rekening houden met de mogelijkheid van een biochemische hydrolyse. We moeten, werkend met grond als omzettingsmedium, trachten de beide hydrolyseerende krachten te scheiden. Dit kan geschieden door steriliseering van den grond. Zooals reeds eerder opgemerkt, blijkt steriliteit in grond zeer

moeilijk te realiseeren. Volgens WAKSMAN (86) is grond steriel te krijgen na langdurige verhitting, b.v. gedurende 2 uur in autoclaaf bij ± 115 °C óf door middel van stoomen, op 7 achtereenvolgende dagen, gedurende 1 uur. Verhitting van den grond gedurende 1 uur op 100 °C of behandeling bij lagere temperaturen vernietigt slechts bepaalde groepen microorganismen. Deze partieele sterilisatie kan eveneens bereikt worden door behandeling van den grond met bepaalde antiseptica (toluol, $HgCl_2$, etc.) of zelfs al door den grond aan de lucht te laten drogen.

Voor het door ons gestelde doel zou dus alleen volkomen steriliteit in aanmerking komen. Nu blijkt het, dat de hiertoe benoodigde hitte grooten invloed heeft op de physische en chemische eigenschappen van den grond; b.v. maakt een verhitting bij temperaturen lager dan 100 °C den grond vruchtbaarder, terwijl verhitting bij temperaturen hooger dan 100 °C, minder vruchtbaren grond levert. Dit laatste zou mede veroorzaakt worden door de vorming van voor de plant hoogere giftige stoffen. De pH van den grond wordt eveneens lager. De hoeveelheid oplosbare organische stoffen wordt grooter wanneer grond verhit wordt, waaruit volgt, dat de humusbestanddeelen meer of minder sterk afgebroken worden. Verhitting beïnvloedt eveneens de uitvlokking van de colloïdale bestanddeelen van den grond, waardoor haar physische eigenschappen veranderen.

Nu is het, met het oog op de bestendigheid van het materiaal, dat de physisch-chemische hydrolyse van cyaanamide tot ureum veroorzaakt, gewenscht de mogelijk ongunstige invloed van hooge temperaturen tot een minimum te beperken. We moeten dus een middenweg zien te vinden tusschen den eisch naar volledige steriliteit van den grond en den eisch om de eigenschappen van de verschillende bestanddeelen van den grond zoo min mogelijk ongunstig te beïnvloeden. Bij het beschouwen van de resultaten van proef 1 bleek het, dat bij de gebezigde cyaanamide-concentratie het geheele omzettingsproces zich afspeelt binnen 5–7 etmalen. Een zoodanige behandeling is dus bruikbaar, die de grond gedurende 5–10 dagen in biochemische rust houdt. Hiermee wordt bereikt, dat we uitsluitend de werkzaamheid van de physisch-chemische kracht(en) waarnemen.

Vergeleken werden in verband met het bovenstaande:

A. grond 2 × ½ uur stoomen bij 100 °C met een tusschenpoos van 24 uur.
B. grond 2 × 20 min. verhitten op 115 °C met een tusschenpoos van 24 uur.

In beide gevallen werd de grond, vóór de verhitting, tot ± 40–50 % van haar watercapaciteit bevochtigd, aangezien de micro-organismen in een vochtigen (natten) grond gemakkelijker zijn uit te schakelen dan in een geheel droge.

*Proef 2*

Porties van 100 g grond (L 32), gedurende 2 × ½ uur op 100 °C verhit.
Toegevoegd 10 cc kalkstikstofextract (steriel).
Grond bevochtigd tot 50–60 % van de watercapaciteit.
Omzettingstemperatuur 23 °C.
Grond uitgezaaid op bouillon-agar (pH 7,2).
Resultaten van de bacterietellingen in tabel 2.

TABEL 2

| uitzaaiing na | kiemgetal per 1 g grond |
|---|---|
| 0 h [1]) . . . . . | – [2]) |
| 27 h . . . . . | – [2]) |
| 75 h . . . . . | ± 200.000 [3]) |
| 100 h . . . . . | ± 5.000.000 |
| 148 h . . . . . | ±500.000.000 |

[1]) onmiddellijk na de tweede verhitting.
[2]) cijfers onbetrouwbaar door te klein aantal kolonies per plaat.
[3]) flora ondergaat een duidelijke wijziging.

Uit de resultaten van deze proef valt af te leiden, dat de grond onmiddellijk na het 2 × ½ uur stoomen op 100 °C nog eenige kiemen bevat. Het kiemgetal blijft bij aanwezigheid van cyaanamide onbeteekenend klein, totdat na 50–70 uur bewaring bij 23 °C een zeer explosief verloopende vermeerdering van het aantal kiemen in den grond plaats heeft. Opmerkelijk is het, dat deze vermeerdering geen groot aantal verschillende soorten micro-organismen omvat. De flora na 75–148 uur blijkt merkwaardigerwijze te bestaan uit vertegenwoordigers van de Pseudomonasgroep met een op den voorgrond treden van „fluorescenten". Aldus heeft de verhitting op 100 °C de schimmels en de sporevormers onder de bacteriën geheel uitgeschakeld. Mogelijkerwijs is dit op den voorgrond treden van bepaalde groepen bacteriën ook een gevolg van den invloed door het cyaanamide uitgeoefend.

We kunnen er dus niet zeker van zijn, dat in grond verhit op 100 °C (2 × ½ uur) de biochemische krachten onwerkzaam zijn geworden, zeker niet, nadat de grond 60–70 uur bij 23 °C gestaan heeft. Dit blijkt ook duidelijk uit de resultaten van de volgende proef.

*Proef 3*

Porties van 100 g grond (L 32), 2 × ½ uur op 100 °C verhit.
Toegevoegd 10 cc kalkstikstof-extract, bevattend:
8,1 mg cyaanamide-N,
0,7 mg ureum-N.

Grond bevochtigd tot 50–60 % van de watercapaciteit.
Omzettingstemperatuur 23 °C.
Analyses op ureum en ammoniak.
Resultaten in tabel 3 en fig. 3.

TABEL 3

*Cyaanamideafbraak in, op 100 °C verhitten, grond*

| analyse na | N in mg per 100 g grond | |
|---|---|---|
| | ureum-N | ammoniak-N |
| 0 h . . . . . | 0,7 | n. bep. |
| 27 h . . . . . | 2,6 | 2,4 |
| 75 h . . . . . | 4,3 | 2,4 |
| 100 h . . . . . | 5,0 | 3,0 |
| 148 h . . . . . | 3,9 | 4,7 |
| 264 h . . . . . | 1,8 | 8,7 |

De resultaten van deze proef doen ons zien, dat in grond, waarin we mogen aannemen, dat gedurende de eerste 75 uur van de omzetting de biochemische activiteit door de voorafgaande verhitting op 100 °C voor het grootste gedeelte geremd wordt, de ureumvorming uit cyaanamide duidelijker naar voren komt dan in den onbehandelden grond. Dit wijst op een ureumvorming buiten de medewerking van de micro-organismen om. Het weer opleven van de microflora, gebleken uit proef 2, is ook terug te vinden in de ammoniakcijfers, die, nadat de grond 100 uur bij 23 °C gestaan heeft, regelmatig toenemen ten koste van de gevormde ureum. Tevens blijkt uit fig. 3, waarin de vermeerdering van het aantal bacteriën (proef 2) eveneens is aangegeven, dat er een correlatie bestaat tusschen een verhoogd ammoniakcijfer en het herstel van de microflora. We kunnen dus eenvoudigheidshalve het ammoniakcijfer als maatstaf nemen voor den duur van de biochemische rust in, door hooge temperaturen of op andere wijze, partieel gesteriliseerden grond.

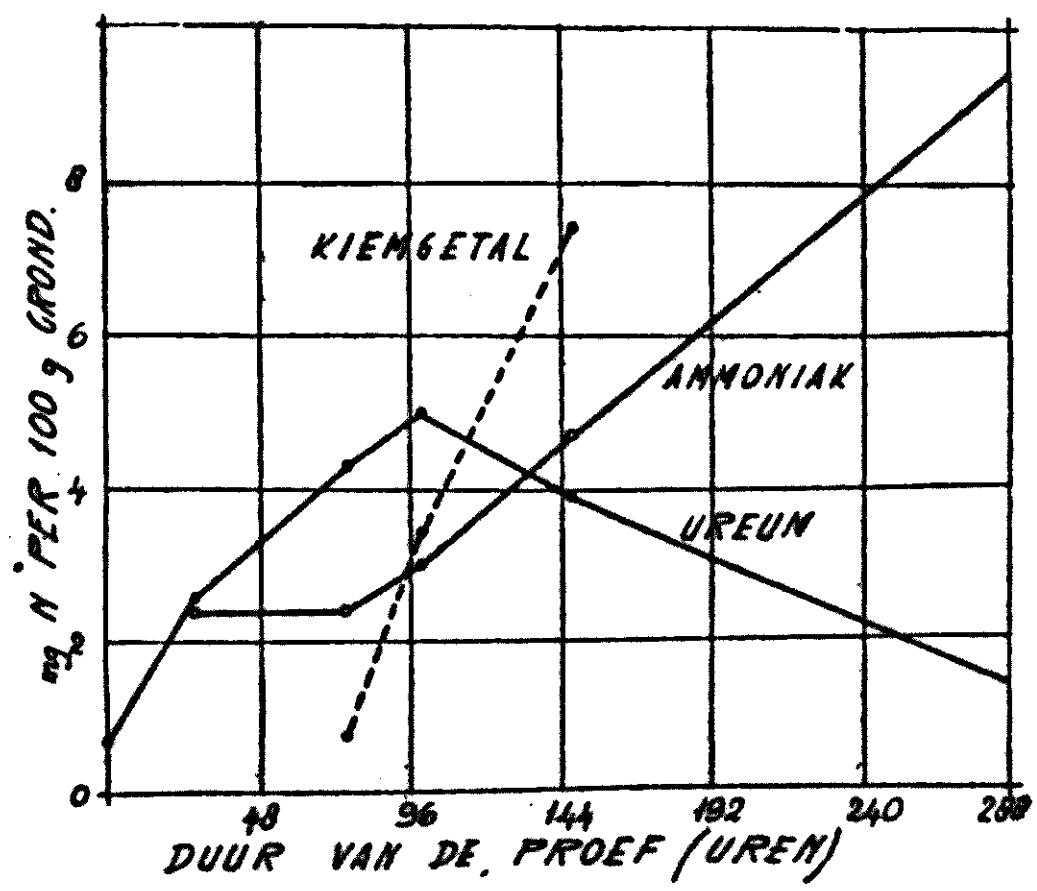



Fig. 3. Afbraak van cyaanamide in, 2 × ½ uur op 100 °C, verhitten grond L 32. Kiemgetal aangegeven als 2[log(kiemgetal × $10^{-5}$)]

Wanneer we de resultaten van proef 3 in hun geheel

beschouwen, komen we tot de conclusie, dat de waargenomen omzettingen van cyaanamide in ureum beschouwd mogen worden als het resultaat van niet-biochemische krachten en dit alleen dàn, wanneer aangetoond is, dat de in dezen, op 100 °C verhitten, grond nog aanwezige micro-organismen niet in staat blijken te zijn cyaanamide, onder ophooping van ureum, om te zetten. Uit hoofdstuk V zal blijken, dat de bedoelde organismen daartoe niet in staat zijn.

Hoe is het nu gesteld met de biochemische rust van grond, die 2 × 20 min. in de autoclaaf op 115 °C werd verhit?

*Proef 4*

Porties van 100 g grond (L 32) verhit op 115 °C.
Toegevoegd 10 cc kalkstikstof-extract, bevattend:
14,5 mg cyaanamide-N,
0,8 mg ureum-N.
Grond bevochtigd tot 50–60 % van de watercapaciteit.
Omzettingstemperatuur 23 °C.
Kwantitatief werden bepaald:
cyaanamide,
ureum en ammoniak.

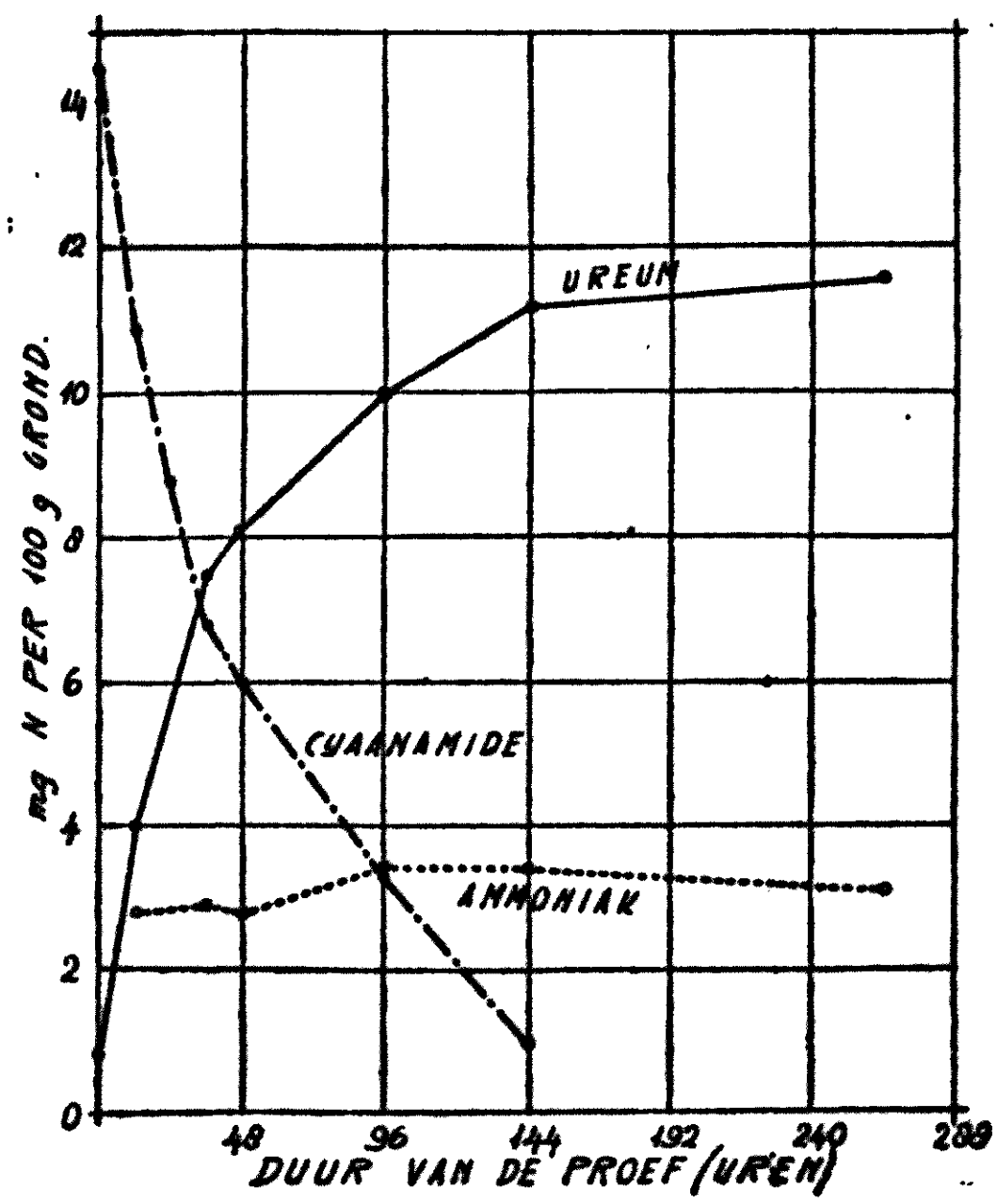



Fig. 4. Omzetting van cyaanamide in, 2 × 20 min. op 115 °C, verhitten grond L 32.

Resultaten in tabel 4 (fig. 4).

Uit de in tabel 4 weergegeven ammoniakcijfers blijkt duidelijk, dat bij deze wijze van verhitting de grond veel langer in biochemische rust blijft dan in het voorgaande geval. Wanneer in dit verband de ureumcijfers bekeken worden, dringt het zich aan ons op, dat de ureumhydrolyse moeilijk anders beschouwd kan worden dan als het resultaat van den invloed van niet-biochemische krachten in den grond. Dit blijkt nog eens duidelijk wanneer we de ureumlijnen van de proeven 1, 3 en 4 met elkaar vergelijken. Zie tabel 5 en fig. 5.

In den niet-verhitten grond is slechts een kleine en zeer kortstondige ureumophooping

TABEL 4 *Cyaanamideafbraak in, op 115 °C verhitten grond*

| analyses na | N in mg per 100 g grond | | |
|---|---|---|---|
| | ureum-N | ammoniak-N | cyaanamide-N |
| 0 h . . . . . | 0,8 | 2,9 | 14,5 |
| 12 h . . . . . | 4,0 | 2,8 | 10,9 |
| 24 h . . . . . | – | – | 8,8 |
| 36 h . . . . . | 7,5 | 2,9 | 6,8 |
| 48 h . . . . . | 8,1 | 2,8 | 6,0 |
| 96 h . . . . . | 10,0 | 3,4 | 3,3 |
| 144 h . . . . . | 11,2 | 3,4 | 1,0 |
| 264 h . . . . . | 11,6 | 3,1 | – |

TABEL 5

*Percentage cyaanamide in ureum en ammoniak omgezet in zandgrond L 32, wél en niet-verhit*

| na | „levende" grond | | grond verhit 100° | | grond verhit 115° | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ureum | ammoniak | ureum | ammoniak | ureum | ammoniak |
| 0 h . . . . . | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 6 h . . . . . | 1,0 | 0,0 | – | – | – | – |
| 12 h . . . . . | 3,0 | 28,0 | – | – | 22,0 | 0,0 |
| 24 h . . . . . | 5,0 | 35,0 | 23,0 | 0,0 | – | – |
| 36 h . . . . . | 14,0 | 65,0 | – | – | 48,0 | 0,0 |
| 48 h . . . . . | 11,0 | 60,0 | – | – | 50,0 | 0,0 |
| 60 h . . . . . | 0,0 | 75,0 | – | – | – | – |
| 72 h . . . . . | – | 85,0 | 43,0 | 0,0 | – | – |
| 96 h . . . . . | – | – | 53,0 | 7,0 | 63,0 | 4,0 |
| 108 h . . . . . | – | 93,0 | – | – | – | – |
| 144 h . . . . . | – | – | 40,0 | 28,0 | 71,0 | 4,0 |
| 264 h . . . . . | – | – | 14,0 | 78,0 | 74,0 | 1,0 |

waar te nemen in verband met de geleidelijk de overhand verkrijgende ureumafbraak. Doordat in den op 100 °C verhitten grond de bacteriologische invloeden tijdelijk zijn uitgeschakeld, kan men een sterkere, langeren tijd aanhoudende ureumophooping waarnemen; ook hier gaat, binnen het bestek van de proef, de ureumophooping over in een afbraak. Tenslotte blijkt de ophooping van ureum weer sterker tot uiting te komen in den op 115 °C verhitten grond. Ureumafbraak was hier, tijdens den duur van de proef, niet aan te toonen.

Opvallend is bij de ureumvorming in den op 115 °C verhitten grond het lage percentage, dat ten laatste gevonden wordt. Na 264 uur is slechts 74 % van de toegevoegde cyaanamide in den vorm van ureum

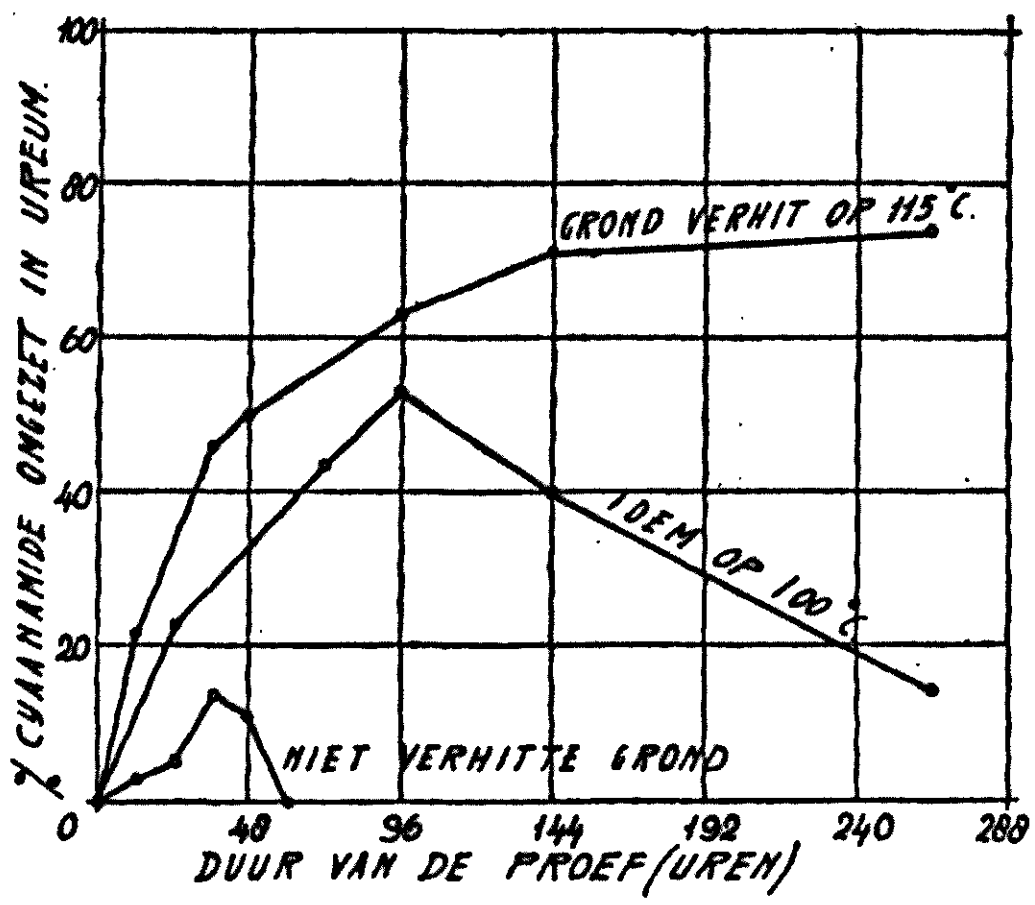



Fig. 5. Ureumvorming uit cyaanamide in wèl en niet-verhitten grond

aanwezig. Hieruit volgt, dat niet alle cyaanamide in ureum wordt omgezet. Aangezien cyaanamide in dezen grond echter na ongeveer 144 uur niet meer is aan te toonen, moeten we het ontstaan van een andere N-verbinding aannemen. Hiervoor komt in aanmerking het dicyaandiamide.

Bij de beschouwing van fig. 5 valt verder op, dat de ureumvorming in op 100 °C verhitten grond minder snel tot stand komt dan in den grond, die op 115 °C werd verhit. Dit kan mogelijk verklaard worden door het later nader te bespreken feit, dat de pH invloed heeft op de hydrolysesnelheid. De gebruikte grond had na verhitting op 100 °C een pH van 6,1, in het andere geval een pH van 5,5.

In op 115 °C verhitten grond kunnen we dus een *ureumniveau* waarnemen, waaronder verstaan moet worden het na een bepaalden tijd in ureum omgezette percentage van de aanvankelijk toegevoegde hoeveelheid cyaanamide. Wanneer dit ureumniveau lager ligt dan 100, blijft er, indien het cyaanamide niet meer is aan te toonen, plaats voor het ontstaan van dicyaandiamide, als gevolg van polymerisatie van cyaanamide. De hoogte van dit ureumniveau blijkt o.m. af te hangen van de grondsoort, juister gezegd van de hoeveelheid actief materiaal in den grond. Wanneer COWIE (12) cyaanamide toevoegde aan, gedurende ½ uur op 120 °C verhitten *zwaren* (Rothamsted) en *lichten* grond (Woburn), dan vond hij na een bepaalden tijd een verschillend percentage cyaanamide in ureum omgezet, nl.:

in den zwaren grond (R) na 20 dagen: 74,3 %,
in den lichten grond (W) na 20 dagen: 32,4 %.

We moesten bij onze beschouwingen naar aanleiding van fig. 5 tot de conclusie komen, dat in verhitten grond een gedeelte van het cyaanamide omgezet wordt in één of andere N-verbinding, die voorloopig nog niet met name bekend is. Uit de beschouwingen op blz. 40 zal blijken, dat het waarschijnlijk is, dat deze onbekende N-verbinding het dicyaandiamide is. Nu is het alleen maar mogelijk dicyaandiamide indirect, langs biologischen weg, aan te toonen, nl. door gebruik te maken van de giftigheid

van dicyaandiamide voor de nitrificeerende organismen in den grond. Voegt men aan den verhitten grond die, vermengd met Ca-cyaanamide, een 10-tal dagen aan omzetting bij 23 °C heeft blootgestaan, een bepaalde hoeveelheid „levenden" grond toe en mengt men dit goed dooreen, dan is uit de nitrificatie af te leiden of er dicyaandiamide aanwezig was naast het ureum. Dicyaandiamide wordt in den grond zeer langzaam geammonificeerd, doch niet genitrificeerd.

*Proef 5*

Porties van 100 g grond (L 32), 2 × 1 uur verhit op 100 °C.

Toegevoegd 10 cc kalkstikstofextract (= ongeveer 12 mg cyaanamide-N).

Grond bevochtigd tot 50 % van de watercapaciteit.

Omzettingstemperatuur 23 °C.

Na 10 dagen werd ureum en ammoniak-gehalte bepaald; hierna werd elke 100 g grond geënt met 10 g „levenden" grond (L 32). Van dit moment af (in tabel: 0 dagen) van tijd tot tijd bepaald: ammoniak- en nitraat-gehalte.

Cijfers van dezen grond worden vergeleken met die gevonden in op dezelfde manier geënten, verhitten grond, bemest met ureum en onbemest (0 N).

Resultaten in tabel 6.

TABEL 6

| analyses na | N in mg per 100 g grond | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | grond + cyaanamide | | grond + ureum | | grond + 0 N | |
| | amm.-N | nitraat-N | amm.-N | nitraat-N | amm.-N | nitraat-N |
| 0 dagen . . . . | 3,8 | 0,2 | 3,8 | 0,2 | 3,8 | 0,2 |
| 9 „ . . . . | 12,7 | 0,4 | 6,6 | 1,4 | 3,7 | 1,1 |
| 19 „ . . . . | 14,3 | 0,2 | 5,4 | 5,8 | 2,5 | 1,5 |
| 30 „ . . . . | 15,3 | 1,0 | 1,2 | 10,3 | 1,8 | 4,5 |
| 48 „ . . . . | 16,7 | 0,3 | 0,6 | 14,3 | 0,5 | 8,0 |

Wanneer we de ammoniakcijfers in de eerste kolom bekijken, zien we dat na 9 dagen al 12,7 mg ammoniak-N in den met cyaanamide bemesten grond aanwezig is, welke hoeveelheid zeer langzaam verder tot 16,7 mg toeneemt. Aangezien bij het begin van de proef aan ammoniak-N + ureum-N 9,4 mg-N aanwezig waren, moet de rest van de gevonden ammoniak afkomstig zijn uit N-verbindingen, die de grond bevatte. Verder valt bij vergelijking der nitraat-N-cijfers onmiddellijk op, dat de naast ureum uit het cyaanamide gevormde, onbekende N-verbinding(en) de nitrificatie niet alleen sterk remt(men), doch onder de aangehouden omstandigheden geheel verhindert(-en).

Deze eigenschap wijst in de richting van dicyaandiamide. We mogen dus met groote waarschijnlijkheid aannemen, dat bij de omzetting van cyaanamide in verhitten grond, *waarbij dus de onderlinge samenhang der opeenvolgende afbraakphasen verbroken wordt*, ureum ontstaat naast één (of meer) andere N-verbindingen, waartoe waarschijnlijk het dicyaandiamide behoort. Nu ontstaat ook volgens ULPIANI (81) door snelle omzetting van cyaanamide ureum, door langzame dicyaandiamide, m.a.w. wanneer het omzettingsproces een snel verloop kan hebben ontstaat ureum. Stokt het proces ergens of heeft het door een of andere oorzaak een te langzaam verloop, dan ontstaat, al naar de heerschende omstandigheden, naast ureum een bepaalde hoeveelheid dicyaandiamide.

De vraag kan nu opgeworpen worden of onder natuurlijke omstandigheden in den grond de dicyaandiamidevorming uit cyaanamide wel mogelijk is. In verband met de zoojuist ontwikkelde zienswijze lijkt dit niet waarschijnlijk, omdat er geen ureumophooping kan plaats vinden, doordat de ontstane ureum onmiddellijk afgevoerd wordt door omzetting in ammoniumcarbonaat. In dit verband moeten we eveneens de zienswijze van BUCHANAN en BARSKY nog eens in herinnering brengen (zie blz. 7). Aangezien de pH van de waterphase in grond meestal lager is dan 7 (en de pH aan het oppervlak der colloïden van den grond is dit zeker!) kan dicyaandiamidevorming niet verwacht worden. Nu mag echter een dergelijk, in vloeistoffen verkregen, resultaat niet zonder meer op het gebeuren in den grond worden overgedragen, zoodat de meening van BUCHANAN en BARSKY een degelijker bewijs vraagt. Dit bewijs wordt gedeeltelijk geleverd in de volgende proef.

*Proef 6*

Grond in porties van 100 g verhit gedurende 2 × 20 min. op 115 °C.
Toegevoegd 10 cc kalkstikstofextract, bevattend:
14,5 mg cyaanamide-N,
0,8 mg ureum.
Nadat dit mengsel 48 uur bij 23 °C gestaan heeft, wordt ter nabootsing van de natuurlijke ureumsplitsing aan den grond toegevoegd een steriele, op pH 6,8 gebufferde, urease-oplossing.
Hierna wordt de grond van tijd tot tijd geanalyseerd op:
cyaanamide-N,
ureum-N en
ammoniak-N.
Resultaten in tabel 7 (fig. 6).

Uit het resultaat van deze proef blijkt duidelijk, dat, nu het afbraakproces een snel verloop kan hebben (het gevormde ureum wordt, onder invloed van de aan den grond toegevoegde urease, na 48 uur voortdurend

TABEL 7

| analyses na | N in mg per 100 g grond | | |
|---|---|---|---|
| | cyaanamide-N | ureum-N | ammoniak-N |
| 0 h . . . . . | 14,5 | 0,8 | 2,9 |
| 24 h . . . . . | 9,2 | – | – |
| 48 h . . . . . | – | 8,1 | – |
| 96 h . . . . . | 2,9 | 0,0 | 11,7 |
| 144 h . . . . . | 0,0 | 0,0 | 13,1 |

TABEL 8

| analyse na | ureum gevormd in grond | |
|---|---|---|
| | verhit op 115 °C | verhit op 115 °C + urease |
| 144 h . . . . . | 71 % | 80 % |

weggenomen) een groot gedeelte van het cyaanamide als ammoniak teruggevonden wordt. Hoewel het tijdstip van de urease-toevoeging eenigszins willekeurig is genomen, zijn we er met deze proef in geslaagd de afbraak van cyaanamide tot de ammoniakphase in den grond geheel te reconstrueeren. Het antwoord op de vraag of er bij deze afbraak ook dicyaandiamide ontstaat, is moeilijk met zekerheid te geven. Toch werden hieromtrent wel duidelijke aanwijzingen verkregen. Wanneer we immers de, na 144 uur verkregen ureumniveau's van proeven 4 en 6 onderling vergelijken, zien we (zie tabel 8) dat er, bij aanwezigheid van urease, méér ureum is gevormd dan in grond waaraan geen urease werd toegevoegd. Uit het verloop van de ammoniaklijn in fig. 6 (proef 6) valt af te leiden, dat het mogelijk is, dat het percentage van 80 % ureum na 144 uur b.v. na 168 uur zelfs nog iets grooter geworden is. In elk geval blijkt uit het voorgaande, dat in verhitten grond zonder urease

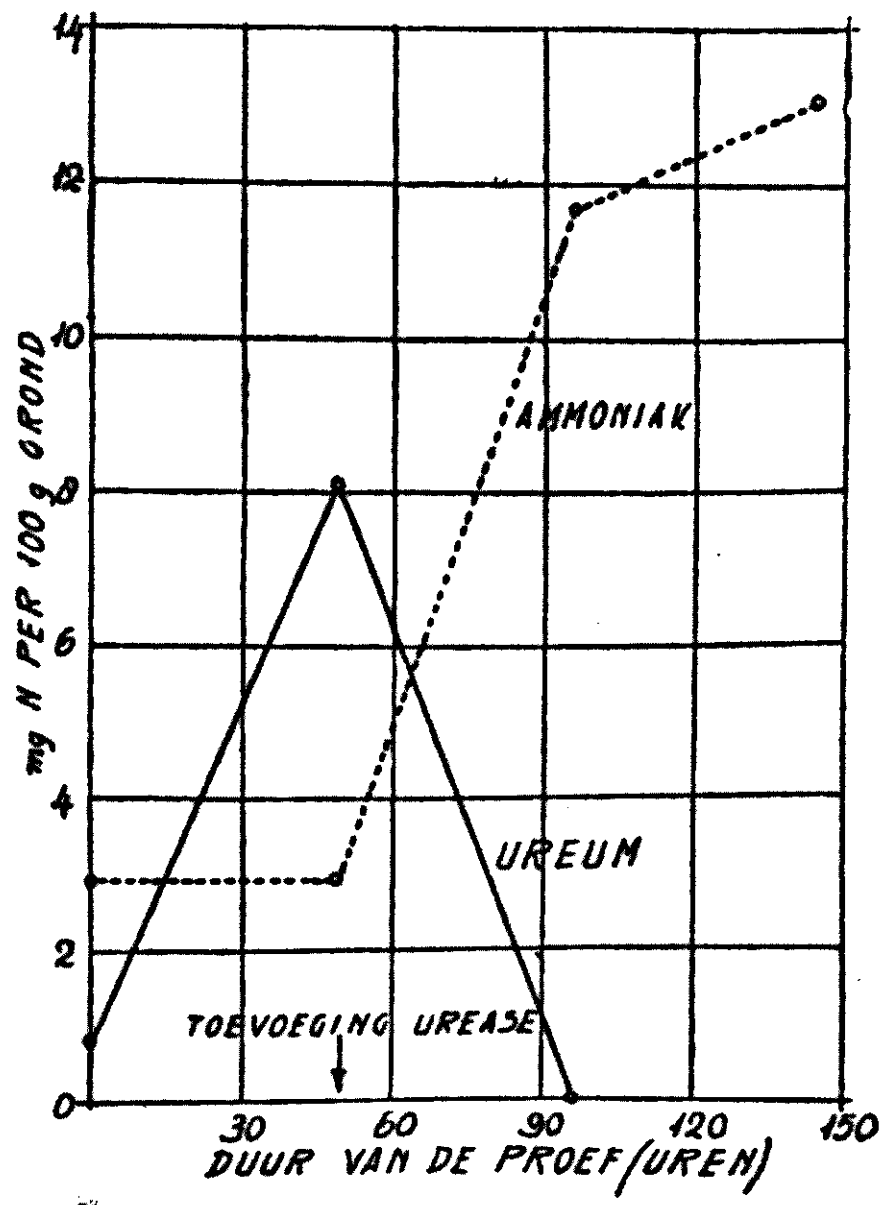



Fig. 6. Afbraak van cyaanamide in op 115 °C verhitten zandgrond (L 32), waaraan urease werd toegevoegd.

meer kans bestaat op dicyaandiamidevorming dan in denzelfden sterielen grond, waaraan wèl urease werd toegevoegd.

De resultaten van de in dit hoofdstuk beschreven proeven kunnen als volgt worden samengevat:

1. Het met kalkstikstof aan den grond toegevoegde Ca-cyaanamide wordt allereerst door chemische werkingen omgezet in ureum. Dit physisch-chemische proces wordt gekatalyseerd aan het adsorbeerende materiaal van den grond. Hierna wordt het gevormde ureum door biochemische activiteit (micro-organismen) afgebroken tot ammoniak. Verder werd duidelijk aangetoond (proef 6), dat de micro-organismen geheel gemist kunnen worden bij de hydrolyse van cyaanamide tot ureum en dat onder normale bemestingsvoorwaarden deze veronderstelde bacterieele ureumvorming (SCHMALFUSZ, 1938) in den grond waarschijnlijk niet bestaat.
2. Het in verhitten grond (115 °C) gevonden in ureum omgezette cyaanamide-percentage (*ureumniveau* genoemd) is niet representatief voor het gebeuren in den „levenden" grond, omdat door de plaatsvindende ureumophooping het afbraakproces niet glad verloopt.
   De in den op 115 °C verhitten grond veronderstelde dicyaandiamidevorming (30 % van de toegevoegde cyaanamide) komt onder „normale" omstandigheden waarschijnlijk *niet*, of in *geringere mate* voor. Onder welke voorwaarden dicyaandiamide in den grond gevormd wordt kan alleen maar nagegaan worden in „kunstgrond"-mengsels (zie hiervoor hoofdstuk II, blz. 9). Veel plaats voor deze vorming blijft er intusschen niet over, aangezien volgens proef 1 (blz. 15) na 110 uur alreeds ± 92 % van de toegevoegde cyaanamide-hoeveelheid in ammoniak was omgezet.
3. Het in sterielen grond bereikte ureumniveau hangt ten nauwste samen met de hoeveelheid adsorbeerend materiaal, die de grond bevat (vergelijk COWIE's proef met *zwaren* en *lichten* grond weergegeven op blz. 22).

In het volgende hoofdstuk zullen de factoren, die de hydrolyse van cyaanamide tot ureum beïnvloeden, aan een nader onderzoek worden onderworpen.

## HOOFDSTUK IV

# NADERE BESCHOUWINGEN OVER DE KRACHTEN, DIE DE OMZETTINGEN VAN HET CYAANAMIDE IN DEN GROND BEPALEN

### § 1. *De invloed van de kationen-bezetting van het actieve oppervlak op deze omzettingen*

Uit de onderzoekingen van HETHERINGTON en BRAHAM (24) bleek, dat de omzetting van cyaanamide in ureum bij 50 °C, met verschillende snelheid, doch kwantitatief verloopt in een zwavelzuur milieu van 0,01, 0,1 en 1 Normaal (zie tabel 9 en fig. 7).

TABEL 9

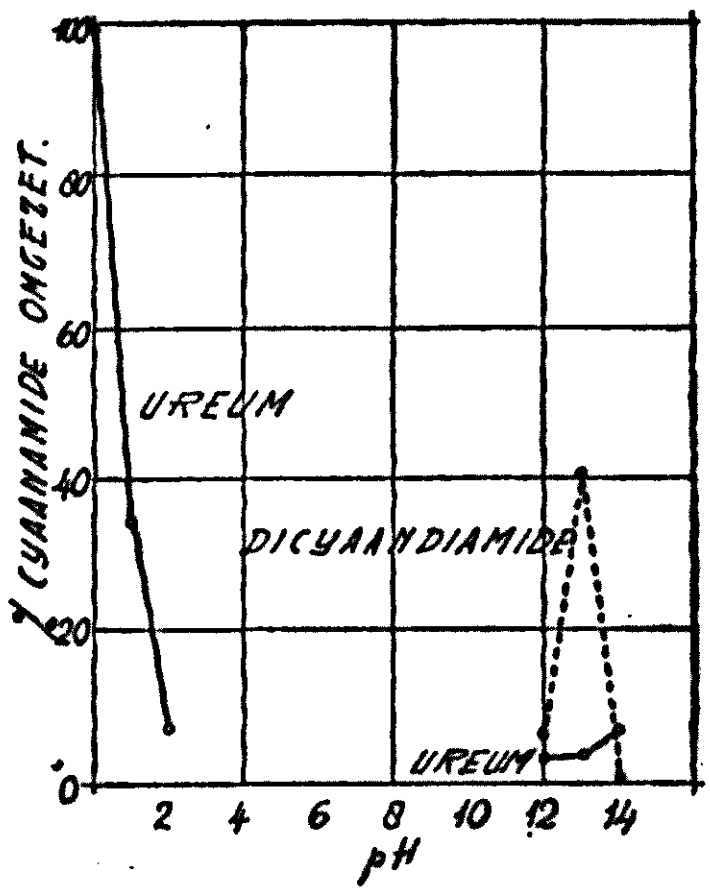
*Invloed van de H-ionenconcentratie op de hydrolyse van cyaanamide tot ureum*

| 0,5 mol. $H_2CN_2$ + zwavelzuur | pH | na 2 uur percentage cyaanamide aanwezig als | | na 4 uur percentage cyaanamide aanwezig als | | na 24 uur percentage cyaanamide aanwezig als | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | cyaanamide | ureum | cyaanamide | ureum | cyaanamide | ureum |
| 0,01 N . . . . | 2 | 93,5 | 7,3 | 89,7 | 10,6 | 62,8 | 37,2 |
| 0,1 N . . . . | 1 | 66,1 | 34,4 | 49,4 | 51,1 | 4,1 | 95,8 |
| 1 N . . . . | 0 | 1,6 | 99,2 | 0,0 | 100,2 | 0,0 | 100,0 |

naar HETHERINGTON en BRAHAM

Terwijl in het milieu met pH 0 (= 1 N zwavelzuur) na 2 uur vrijwel alle cyaanamide in ureum was omgezet, waren bij pH 2 (= 0,01 N zuur) in denzelfden tijd nog maar 7,3 % tot ureum gehydrolyseerd. Bij de hoogste zuurconcentratie verliep de reactie dus zeer veel sneller dan bij maar weinig hoogere pH's. Bij pH 2 was na 24 uur nog bijna 63 % van de oorspronkelijke hoeveelheid cyaanamide als zoodanig aanwezig. Wordt de pH van het omzettingsmilieu echter nóg hooger, dan komt er weer een moment (pH > 10) waarop de hydrolyse van cyaanamide tot ureum weer meer op den voorgrond treedt (zie tabel 10 en fig. 7).

De ureumvorming is bij pH 12 en 13 zeer gering: het grootste gedeelte van het cyaanamide wordt bij de met deze pH overeenkomende $H^+$-ionenconcentraties gepolymeriseerd tot dicyaandiamide. Wanneer nauwelijks waterstof-ionen meer aanwezig zijn (pH = 14) wordt evenwel het groot-




naar HETHERINGTON en BRAHAM

Fig. 7. Het verband tusschen zuurheidsgraad en omzettingen in en cyaanamide-oplossing bij 50 °C. Toestand na 2 uur.

ste gedeelte van het cyaanamide weer omgezet in ureum, terwijl dan de dicyaandiamidevorming te verwaarloozen is.

Uit fig. 7 kunnen we afleiden, dat de hydrolyse van cyaanamide bij pH's van ± 4–10 zeer gering zal zijn, althans, afhankelijk van de temperatuur, zeer langzaam tot stand zal komen. Deze verwachting wordt bevestigd door een proef van SCHMALFUSZ (71), waarbij de omzetting van cyaanamide in buffermengsels van verschillenden zuurheidsgraad werd nagegaan (zie tabel 11).

Uit de hier weergegeven cijfers volgt, dat bij 35 °C in een citraat-HCl-buffer van pH 3,7 na 3 uur nagenoeg geen omzetting van cyaanamide heeft plaats gehad. Ook bij pH 6,8 is de omzetting, zelfs na 5 dagen, te verwaarloozen. Eerst bij pH 9,3–10,3 is na 5 dagen een duidelijke toeneming van het ureumgehalte waar te nemen. Een gedeelte van het cyaanamide wordt bij pH 9,3 ook gepolymeriseerd tot dicyaandiamide. Alhoewel de cijfers onder andere omstandigheden verkregen werden dan die van HETHERINGTON en BRAHAM, kunnen ze toch wel met deze laatste van één gezichtspunt uit beschouwd worden.

We kunnen eruit concludeeren, dat de hydrolyse van cyaanamide tot ureum in waterige oplossing gekatalyseerd wordt door $H^+$-ionen, waarvan de actieve concentratie in de oplossing van grooten invloed is op deze omzetting en op haar snelheid.

Het was te verwachten, dat de aan een adsorbens gebonden $H^+$-ionen, voorzoover ze geïoniseerd zijn, de hydrolyse van cyaanamide tot ureum eveneens zouden katalyseeren en dat de hoeveelheid dezer ionen van

TABEL 10

*Invloed van de H-ionenconcentratie op de hydrolyse en polymerisatie van cyaanamide*

| Conc. NaOH mol/liter | pH | na 2 uur percentage van totaal-N aanwezig als | | | Na 3 uur percentage van totaal-N aanwezig als | | | na 20 uur percentage van totaal-N aanwezig als | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | cyaan-amide | ureum | dicyaan-diamide | cyaan-amide | ureum | dicyaan-diamide | cyaan-amide | ureum | dicyaan-diamide |
| 0,01 | 12 | 90,4 | 3,3 | 6,3 | 85,8 | 3,3 | 10,9 | 47,2 | 4,9 | 47,0 |
| 0,1 | 13 | 55,6 | 3,8 | 40,6 | 44,4 | 4,1 | 51,5 | 14,1 | 10,1 | 75,8 |
| 1,0 | 14 | 92,3 | 7,0 | 0,7 | 89,3 | 8,3 | 2,4 | 62,7 | 34,4 | 2,9 |

naar HETHERINGTON en BRAHAM

TABEL 11

*De hydrolyse en polymerisatie van cyaanamide bij bepaalde zuurheidsgraad bij 35 °C*

| buffer | proefduur | pH | N in mg per 100 cc oplossing | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | totaal-N | cyaanamide-N | dicyaan-diamide-N | ureum-N |
| *Citraat* HCl | 3 uur | 3,7 | 30,3 | 29,7 | 0,2 | 0,2 |
| | 5 dagen | 4,0 | 30,0 | 29,4 | 0,2 | 1,0 |
| | 14 „ | 4,0 | 30,6 | 29,7 | 0,3 | 0,0 |
| *Phosphaat* | 3 uur | 6,8 | 30,3 | 29,2 | 0,2 | 0,0 |
| | 5 dagen | 6,7 | 30,3 | 29,2 | 0,3 | 0,0 |
| | 14 „ | 7,7 | 31,0 | 30,2 | 0,0 | 0,7 |
| *Boraat* HCl | 3 uur | 9,3 | 30,3 | 29,3 | 0,2 | 0,0 |
| | 5 dagen | 9,2 | 30,3 | 26,1 | 0,9 | 2,0 |
| | 14 „ | 9,2 | 31,0 | 21,8 | 6,3 | 2,9 |
| *Boraat* NaOH | 3 uur | 11,0 | 30,2 | 29,2 | 0,1 | 0,0 |
| | 5 dagen | 10,3 | 30,5 | 18,4 | 4,8 | 7,3 |
| | 14 „ | 9,7 | 30,9 | 14,6 | 1,9 | 14,4 |

naar SCHMALFUSZ

veel belang zou zijn bij deze hydrolyse. Om dit na te gaan werd de omzetting van cyaanamide onderzocht in een waterige oplossing bij aanwezigheid van het adsorbens dusarit.

*Proef 7*

Een ruime hoeveelheid dusarit werd in twee porties verdeeld. De ééne portie werd omgezet in H-dusarit, de andere in Ca-dusarit. Een deel van de beide, aldus verkregen, dusariten werd gemengd in de verhouding 1 : 1. Dit leverde een H/Ca-dusarit. Vervolgens werden telkens 90 gram kwartszand gemengd met 10 gram van elk der drie dusariten. Aldus werden drie series dusaritmengsels verkregen met de volgende pH ($H_2O$):

1. H-dusaritmengsel pH: 1,8.
2. H/Ca-dusaritmengsel pH: 3,2.
3. Ca-dusaritmengsel pH: 9,3.

Aan elke serie werd, na verhitting gedurende 2 × 20 min. op 115 °C, toegevoegd 10 cc van een steriel kalkstikstofextract. De omzetting had plaats bij 23 °C. Na verschillende tijden werden ureum en ammoniak bepaald. Eenige malen werd tevens kwalitatief gereageerd op cyaanamide. Resultaten in tabel 12 (fig. 8).

TABEL 12

*De hydrolyse van cyaanamide in ureum in dusaritmengsels van verschillende pH*

| analyses na | N in mg per 100 g mengsel | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | H-dusarit | | H/Ca-dusarit | | Ca-dusarit | |
| | ureum-N | ammoniak-N | ureum-N | ammoniak-N | ureum-N | ammoniak-N |
| 0 h . . . . . | 0,8 | sp. | 0,8 | sp. | 0,8 | sp. |
| 24 h . . . . . | 7,1 | sp. | 2,5 | sp. | 1,8 | sp. |
| 72 h . . . . . | 7,1 | sp. | 4,9 | sp. | 2,3 | sp. |
| 144 h . . . . . | 6,1 | sp. | 5,5 | sp. | 3,2 | sp. |

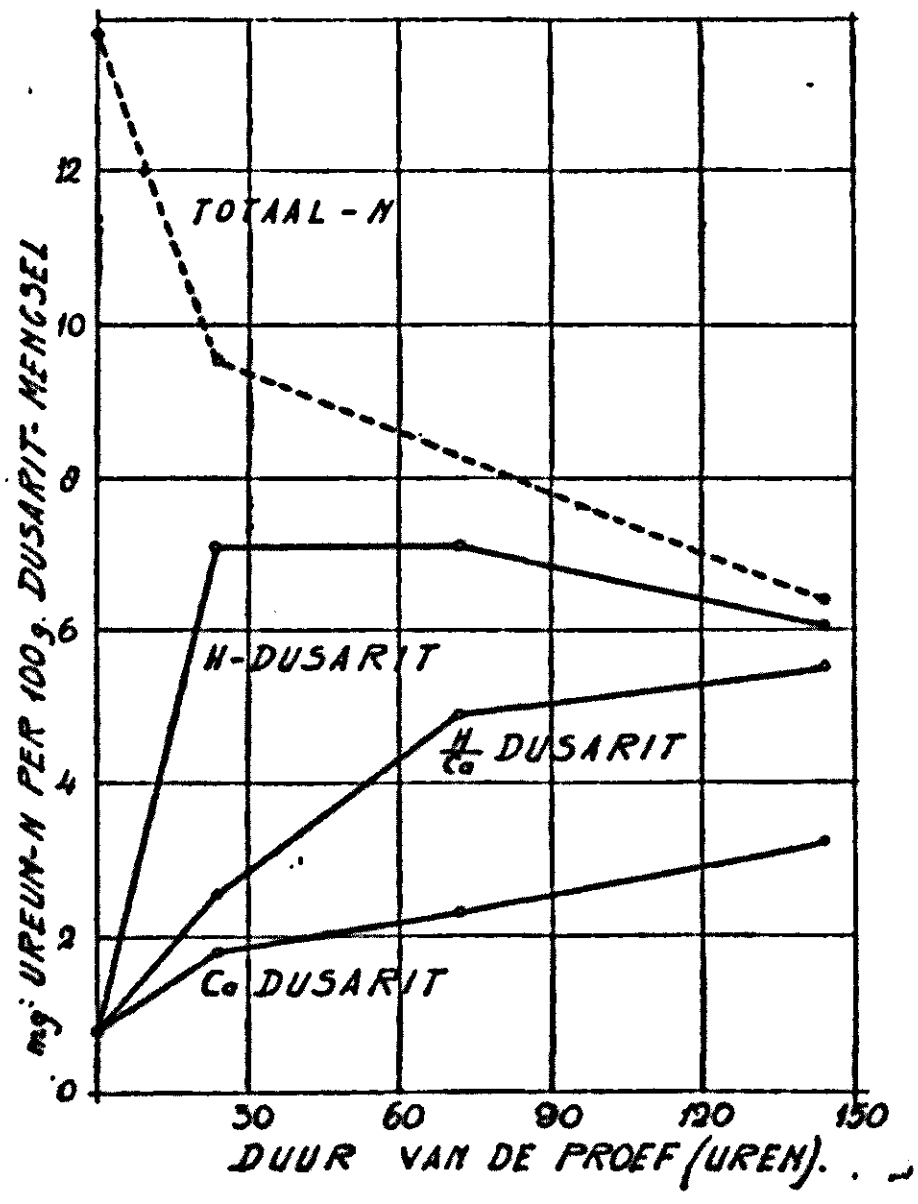



Fig. 8. Ureumvorming uit cyaanamide in gesteriliseerde dusarit-mengsels met verschillenden zuurheidsgraad.

Opmerking:

1. Bij deze proef bleek, dat dusarit niet alle met het kalkstikstof-extract toegevoegde stikstof „teruggeeft", wanneer gepercoleerd werd met N/2 $K_2SO_4$. Bij de H-dusarit bedroeg het in het percolaat bepaalde totaal-N-gehalte na:

   24 uur:
   9,5 mg (toegevoegd 13,8 mg),
   6 dagen:
   6,4 mg (toegevoegd 13,8 mg),
   20 dagen:
   5,1 mg (toegevoegd 13,8 mg).
2. In het H-dusarit-mengsel was na 24 uur de cyaanamide reactie negatief.

Ondanks het feit, dat dusarit een gedeelte van de met het kalkstikstof-extract toegevoegde N-verbindingen bij de percolatie vastgehouden heeft, volgt uit deze proef zeer duidelijk het verschil in omzettingssnelheid van het cyaanamide tusschen de drie verschillende dusariten. Zoo was b.v. na 24 uur door de H-dusarit 6,3 mg ureum-N gevormd, door de H/Ca-en Ca-dusarit respectievelijk 1,7 en 1,0 mg. Hieruit volgt dus, parallel met den gang van zaken in oplossingen met bepaalde $H^+$-ionenconcentratie, een katalyseerende invloed van $H^+$-ionen, die zich bevinden in de attractiesfeer van een adsorbens, op de hydrolyse van cyaanamide tot ureum.

In den grond, waar blijkens het in hoofdstuk III gevondene eveneens,

langs physisch-chemischen weg, ureum gevormd wordt uit cyaanamide, kunnen we onderscheiden:

*a*. een inactief geraamte („Bodenskelett");
*b*. een biochemisch-actieve microflora;
*c*. bestanddeelen met colloïdale eigenschappen:

α het organische adsorbeerende complex („humus"),
β de colloïdale anorganische fractie, samengesteld uit:

1. kleimineralen (montmorilloniet, kaoliniet, muscoviet, etc.),
2. hydraten van de sesquioxyden $Al(OH)_3$ en $Fe(OH)_3$,
3. moeilijk oplosbare zouten van Ca en Fe.

Bij de niet-biochemische hydrolyse van cyaanamide zullen dus de onder *c* genoemde verbindingen hun medewerking verleenen. Bij nader onderzoek kan dan verder blijken, dat één of enkele van de hierboven genoemde onderdeelen van de colloïdale bestanddeelen de voor de hydrolyse noodzakelijke katalyseerende werking blijkt(-en) te bezitten. Ook is het mogelijk, en alle aanwijzingen gaan in die richting, dat het vermogen om cyaanamide te hydrolyseeren een eigenschap is van het colloïdale, actieve oppervlak als zoodanig en niet die van een of andere bepaalde verbinding (b.v. Fe- of $Al(OH)_3$, $MnO_2$, dusarit e.d.). Weinig is bekend over de hoeveelheid gehydrateerde oxyden van Fe, Al en Si in de gronden van de gematigde luchtstreken (49). We kunnen aannemen, dat ze daar dan ook niet de belangrijkste rol zullen spelen bij de hydrolyse van cyaanamide tot ureum. Onze aandacht blijft daarom gevestigd op de colloïdale humusbestanddeelen en het anorganische adsorbeerende complex.

In het voorgaande bleek, dat de aanwezigheid van materiaal met oppervlakte-activiteit in een cyaanamide-oplossing leidt tot ureumvorming, mits er aan het actieve oppervlak voldoende katalyseerende $H^+$-ionen gebonden zijn. Van belang voor het verloop van de reactie cyaanamide-ureum zullen dus zijn:

1. de hoeveelheid actief materiaal;
2. de ionenbezetting van het actieve materiaal: m.a.w. de verhouding waterstof : basen van de aan de grensvlakken geadsorbeerde kationen.

Deze opvatting vindt haar bevestiging in de resultaten van de volgende proeven met grond (L 32).

*Proef 8*

Hier werden vergeleken de omzetting van cyaanamide in zandgrond (L 32) en die in een mengsel van 20 gram zandgrond (L 32) + 80 gram kwartszand.

Porties van 100 gram grond of -mengsel werden gedurende 20 × 20 min. op 115 °C verhit. Aan den aldus toebereiden grond werd toegevoegd 10 cc kalkstikstofextract, dat bevatte:

14,5 mg cyaanamide-N en
0,8 mg ureum-N.

Omzettingstemperatuur 23 °C.

Na verschillende tijden werden bepaald:
cyaanamide (gedeeltelijk kwalitatief),
ureum en
ammoniak.

Resultaten in tabel 13 (fig. 9).

TABEL 13

*De omzetting van cyaanamide in grond en in grond-kwartszandmengsel*

| analyses na | N in mg per 100 g mengsel | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 100 g grond L 32 | | | 20 g grond + 80 g kwartszand | | |
| | cyaanamide-N | ureum-N | ammoniak-N | cyaanamide-N | ureum-N | ammoniak-N |
| 0 h . . . . . | 14,5 | 0,8 | 2,9 | 14,5 | 0,8 | 1,0 |
| 12 h . . . . . | 10,9 | 4,0 | 2,8 | – | – | – |
| 18 h . . . . . | – | – | – | ++ | 1,7 | 1,4 |
| 24 h . . . . . | 8,8 | – | – | – | – | – |
| 36 h . . . . . | 6,8 | 7,5 | 2,9 | – | – | – |
| 48 h . . . . . | 6,0 | 8,1 | 2,8 | – | – | – |
| 66 h . . . . . | – | – | – | (++) | 2,8 | 1,1 |
| 96 h . . . . . | 3,3 | 10,0 | 3,4 | – | – | – |
| 144 h . . . . . | 0,0 | 11,2 | 3,4 | – | – | – |
| 162 h . . . . . | – | – | – | (++) | 2,8 | 2,0 |
| 264 h . . . . . | – | 11,6 | 3,1 | – | – | – |

++ → (++) = afnemende cyaanamide-reactie

Het mengsel van grond + kwartszand bevat $^1/_5$ gedeelte van het actieve materiaal (humus + klei) van den onvermengden grond. Aan de weergegeven cijfers is duidelijk te zien, dat de hoeveelheid actief materiaal van fundamenteele beteekenis is voor de omzetting van cyaanamide in ureum. Zoo was b.v. in zuiveren grond na 12 en 144 uur van 14,5 mg cyaanamide-N, resp. 3,2 en 10,4 mg in ureum omgezet. Na 18 en 162 uur was dit voor het mengsel grond + kwartszand resp. 1,1 en 2,0 mg. Na 144 uur was alle cyaanamide omgezet in zuiveren grond; in het mengsel na 162 uur nog maar een klein gedeelte. In het laatste geval kon het cyaanamide gedurende de geheele proef in flinke hoeveelheden aangetoond worden.

Uit deze beide proeven volgt, dat een grond met een laag gehalte actief

materiaal in een bepaalde tijdseenheid (aangenomen dat de ionenbezetting dezelfde is) een veel kleinere hoeveelheid cyaanamide in ureum om zal kunnen zetten dan een grond met een hoog gehalte aan bestanddeelen met oppervlakte-activiteit.

Over den invloed van de verhouding waterstof: basen van de aan het actieve oppervlak van den grond geadsorbeerde kationen op de hydrolyse van cyaanamide licht de volgende proef ons in.

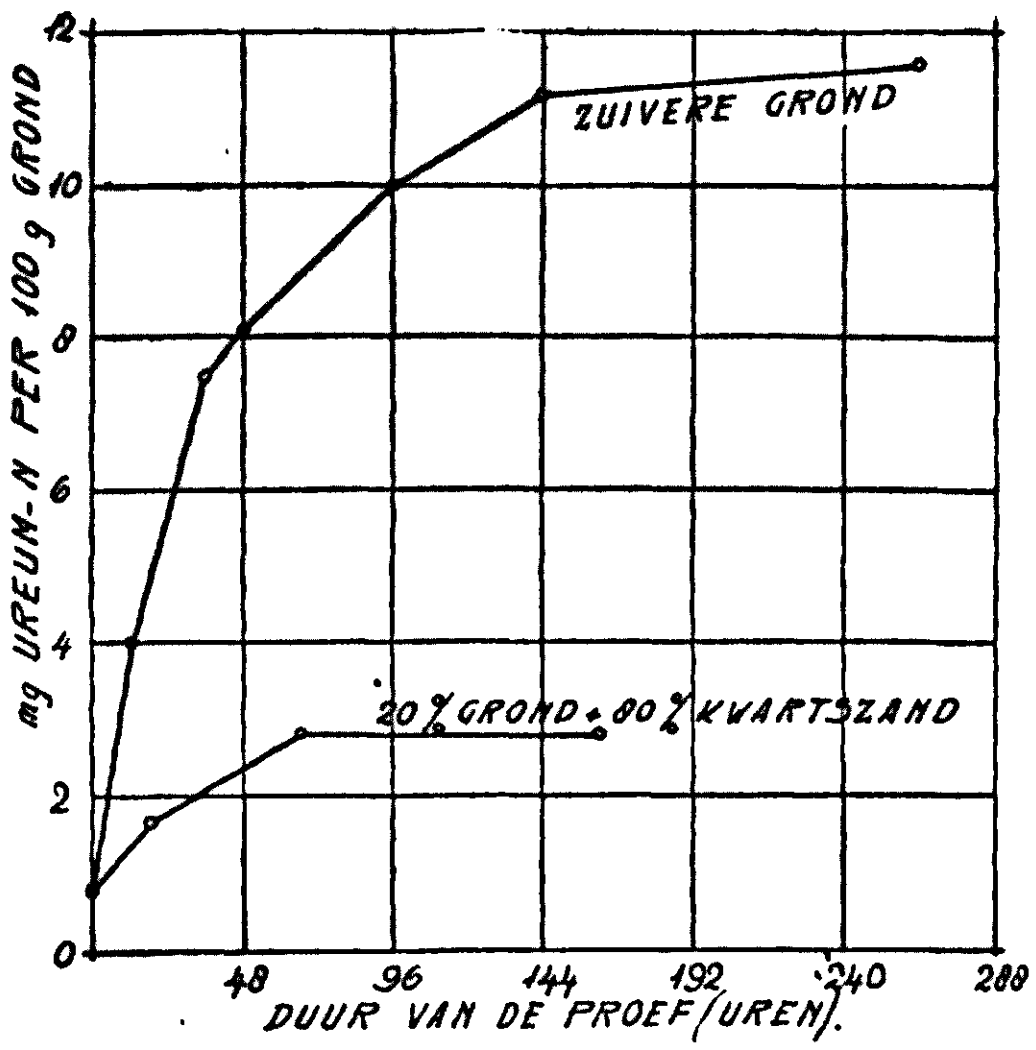



Fig. 9. Ureumvorming uit cyaanamide in op 115 °C verhitte grond-kwartszandmengsels met verschillende hoeveelheden actief materiaal

*Proef 9*

Uitgaande van zandgrond L 32 worden een H-grond en twee Ca-gronden gemaakt. De, als pH uitgedrukte, actieve $H^+$-ionenconcentratie van deze drie gronden was respectievelijk 3,5; 7,3; 8,0.

Porties van 100 gram grond werden gedurende 2 × 1 uur met een tusschenruimte van 48 uur bij 100 °C gestoomd, waarna er 10 cc steriel kalkstikstofextract aan werd toegevoegd. Het extract bevatte aan cyaanamide:

bij den H-grond (pH 3,5): 13,5 mg N,
bij den Ca-grond (pH 7,3): 10,0 mg N,
bij den Ca-grond (pH 8,0): 12,8 mg N.

De omzettingstemperatuur bedroeg 23 °C.

Na verschillende tijden werd geanalyseerd op:
cyaanamide (kwalitatief),
ureum,
ammoniak.

Resultaten van dit onderzoek in tabel 14 (fig. 10).

Uit de resultaten van deze proef blijkt duidelijk, dat er, bij een constante hoeveelheid actief materiaal, een verband bestaat tusschen de mate waarin het actieve oppervlak bezet is met $H^+$-ionen en de snelheid waarmee de hydrolyse tot stand komt en de ten laatste bereikte hoeveelheid in ureum omgezette cyaanamide („ureumniveau").

TABEL 14

*Omzetting van cyaanamide in ureum in zandgrond L 32 bij verschillenden zuurheidsgraad*

| analyses na | N in mg per 100 g grond | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | H-grond pH 3,5 | | | Ca-grond pH 7,3 | | | Ca-grond pH 8,0 | | | |
| | ureum-N | ammoniak-N | perc. cyaanamide in ureum omgezet | ureum-N | ammoniak-N | perc. cyaanamide in ureum omgezet | cyaanamide | ureum-N | ammoniak-N | perc. cyaanamide in ureum omgezet |
| 24 h | 4,4 | 2,4 | 28 | 2,7 | 2,2 | 20 | ++ | 1,8 | 2,9 | 9 |
| 48 h | 6,7 | 2,2 | 46 | 3,3 | 2,1 | 26 | + | 2,3 | 3,6 | 18*) |
| 120 h | 8,8 | 3,2 | 68 | 4,2 | 2,5 | 39 | (+) | 3,7 | 3,2 | 26 |
| 230 h | 9,3 | 2,7 | 68 | 4,2 | 3,0 | 41 | – | – | – | – |

*) na 72 uur

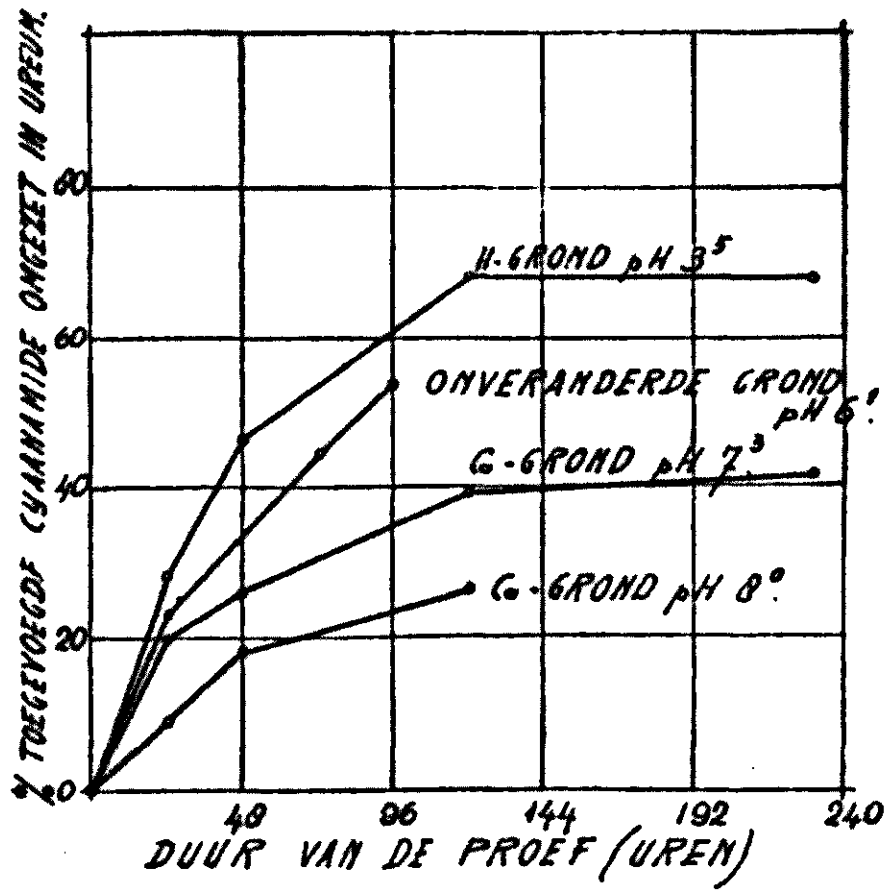



Fig. 10. Ureumvorming uit cyaanamide in, op 100 °C verhitten grond (L 32) bij verschillenden zuurheidsgraad

Tevens blijkt, dat de per tijdseenheid gevormde hoeveelheid ureum zeer snel afneemt met opklimmende pH, waarbij opgemerkt dient te worden, dat het verschil bij de lagere pH's kleiner is dan bij hoogere waarden daarvan. Zoo vonden we in de suspensie van den H-grond na 24 uur, dat 28 % van de toegevoegde cyaanamide in ureum was omgezet. Voor den onbehandelden grond (in grafiek aangegeven met „normaal") was dit ± 25 %.[1]) Het pH-verschil tusschen beide gronden bedroeg 6,1 – 3,5 = 2,6. Vergelijken we echter den „normalen" grond van pH 6,1 met den Ca-grond van pH 8,0, dan is het onderlinge verschil veel grooter. Aan ureum werd b.v. na 72 uur bij pH 6,1 een percentage van het oorspronkelijk aanwezige cyaanamide gevonden van 44 %; bij pH 8,0 was dit 18 %. Het pH-verschil bedroeg hier 2,9. De na vijf dagen bereikte ureumniveau's waren:

in den H-grond (pH 3,5): 68 %,
in den Ca-grond (pH 7,3): 41 % en
in den Ca-grond (pH 8,0): 26 %.

We kunnen nu, afgezien van het temperatuursverschil tusschen beide

[1]) In fig. 10 is de ureumlijn van den „normalen" grond verkregen bij een proef (die niet verder werd vermeld) genomen onder omstandigheden, die geheel vergeleken kunnen worden met die van proef 9.

proeven, een vergelijking maken tusschen de in buffers van bepaalde pH bereikte omzettingen van cyaanamide en die in grond met verschillende waterstof-ionenconcentratie (vergelijk tabellen 11 en 14 in tabel 15).

TABEL 15

*Ureumvorming uit cyaanamide in buffermengsels en grond met overeenkomstigen zuurheidsgraad*

| analyse na | percentage cyaanamide omgezet in ureum, in | |
|---|---|---|
| | buffermengsel | zandgrond L 32 |
| 5 dagen | citraat/HCl pH 3,7 . . . 4 % | H-grond pH 3,5 . . . . 68 % |
| 5 dagen | phosphaat pH 6,8 . . . 0 % | Ca-grond pH 7,3 . . . . 41 % |

Er bestaat dus een duidelijk verschil in omzettingspercentage tusschen grond en buffermengsels ten gunste van den grond, niettegenstaande langs electrometrischen weg in beide gevallen ongeveer dezelfde actieve $H^+$-ionenconcentratie gemeten werd! Het verschil wordt nog grooter wanneer we het verschil in temperatuur tusschen de proeven van SCHMALFUSZ en die van ons zelf in aanmerking nemen.

De verklaring hiervoor is te zoeken in het volgende. Wanneer men van een grond de pH langs electrometrischen weg meet, dan vinden we een waarde die ligt tusschen de pH van het ultrafiltraat en die van de gedispergeerde deeltjes [PALLMANN (56), LOOSJES (48)].

In de „kationenwolk" rondom de adsorbeerende gronddeeltjes is de $C_H$ dus grooter dan de electrometrische pH-meting zou doen vermoeden.

Hoeveel van de aan een bepaald adsorbens gebonden $H^+$-ionen aan de totstandkoming van de suspensie-pH medewerken is van te voren niet met zekerheid te zeggen. Dit aantal is wel door een berekening te benaderen. Zoo vond PALLMANN (56) voor de werkzaamheid van de aan een H-klei uitwisselbaar gebonden H-ionen een waarde van 0,508, hetgeen wil zeggen, dat ongeveer van elke twee gebonden $H^+$-ionen er één aan de totstandkoming van het suspensie-effect meewerkte.

Wanneer we nu de omzettingspercentages bij de cyaanamidehydrolyse in den grond, vergeleken met die, waargenomen in buffers, nogmaals bekijken, dan moeten we aannemen, dat het Ca-cyaanamide (respectievelijk het cyaanamide) niet alleen gehydrolyseerd wordt in het ultrafiltraat (vloeistof), doch ook, en het meest, in de attractiesfeer van de vaste phase. Hierbij komt de omzettingssnelheid van de reactie cyaanamide-ureum in grond dus niet overeen met de pH van de suspensie, doch met de zooveel lagere waarde, heerschend in de attractiesfeer van de grensvlakken van het adsorbeerende materiaal.

Vervolgens moest nagegaan worden of een bepaald onderdeel van het colloïdale materiaal in den grond verantwoordelijk is voor de in sterielen grond waargenomen cyaanamidehydrolyse.

We mogen aannemen, dat de gehydrateerde sesquioxyden in den als proefgrond gebezigden zandgrond L 32 niet of in zeer bescheiden mate voor zullen komen. Blijft dus over uit te maken of de humusbestanddeelen òf de anorganische colloïdale fracties de hydrolyse tot stand brengen. Ook kan het blijken, dat beide tot de ureumvorming uit cyaanamide in staat zijn.

Bij den zandgrond L 32 zal het grootste gedeelte van de anorganische fracties omgeven zijn door een huidje van organische stof. Daardoor meten we in sterielen grond waarschijnlijk de hydrolyseerende werking t.o.v. cyaanamide van de organische fractie, hoogstens van beide samen. Door de organische stof in den grond met behulp van waterstofperoxyde te oxydeeren kunnen we de anorganische fracties „bloot leggen".

*Proef 10*

Een hoeveelheid zandgrond L 32 werd met 10-procentige $H_2O_2$ gedurende eenige uren op een kokend waterbad geoxydeerd. De oxydatie werd zóólang voortgezet, dat een hernieuwde toevoeging van waterstofperoxyde geen opbruisching meer veroorzaakte. Hierna werd de geoxydeerde grond afgezogen over een collodionmembraan (op een afzuigtrechter) en, na goed uitgewasschen te zijn met aq. dest., gedroogd en in porties van 100 gram verdeeld. De aldus verkregen grond had een pH van $\pm$ 4. Na gedurende 2 $\times$ 1 uur op 100 °C verhit te zijn werd aan den grond toegevoegd een kalkstikstofextract, dat bevatte:

11,3 mg totaal-N,
9,4 mg cyaanamide-N en
0,8 mg ureum-N.

Omzettingstemperatuur 23 °C.

Na verschillende tijden werden bepaald:
cyaanamide en
ureum.

Resultaten in tabel 16 (fig. 11).

TABEL 16

*Ureumvorming uit cyaanamide in met $H_2O_2$ geoxydeerden zandgrond L 32*

| analyses na | cyaanamide-N | ureum-N | percentage cyaanamide in ureum omgezet |
|---|---|---|---|
| 0 h . . . . . | 9,4 | 0,8 | 0 |
| 24 h . . . . . | 6,7 | 3,3 | 26 |
| 48 h . . . . . | 5,3 | 4,7 | 43 |
| 72 h . . . . . | 3,7 | 5,3 | 48 |
| 120 h . . . . . | 2,3 | – | – |
| 144 h . . . . . | – | 5,4 | 48 |

Uit tabel 16 en fig. 11 volgt duidelijk, dat ook het anorganische materiaal van den grond in staat is cyaanamide te hydrolyseeren tot ureum. Na 24 uur is reeds 28 % van de toegevoegde cyaanamide gehydrolyseerd. Het na 72 uur in dezen geoxydeerden grond bereikte ureumniveau ligt bij ± 50 %. Aangezien na een bepaald aantal uren de gevormde ureumhoeveelheid niet meer grooter wordt, terwijl het cyaanamidegehalte verder blijft afnemen, denken we hier aan een mogelijkheid van dicyaandiamide-vorming als gevolg van een polymerisatie van cyaanamide. Hoe dit ook zij, op dit oogenblik is het feit het belangrijkst, dat het anorganische materiaal in den grond inderdaad in staat is tot hydrolyseering van cyaanamide.

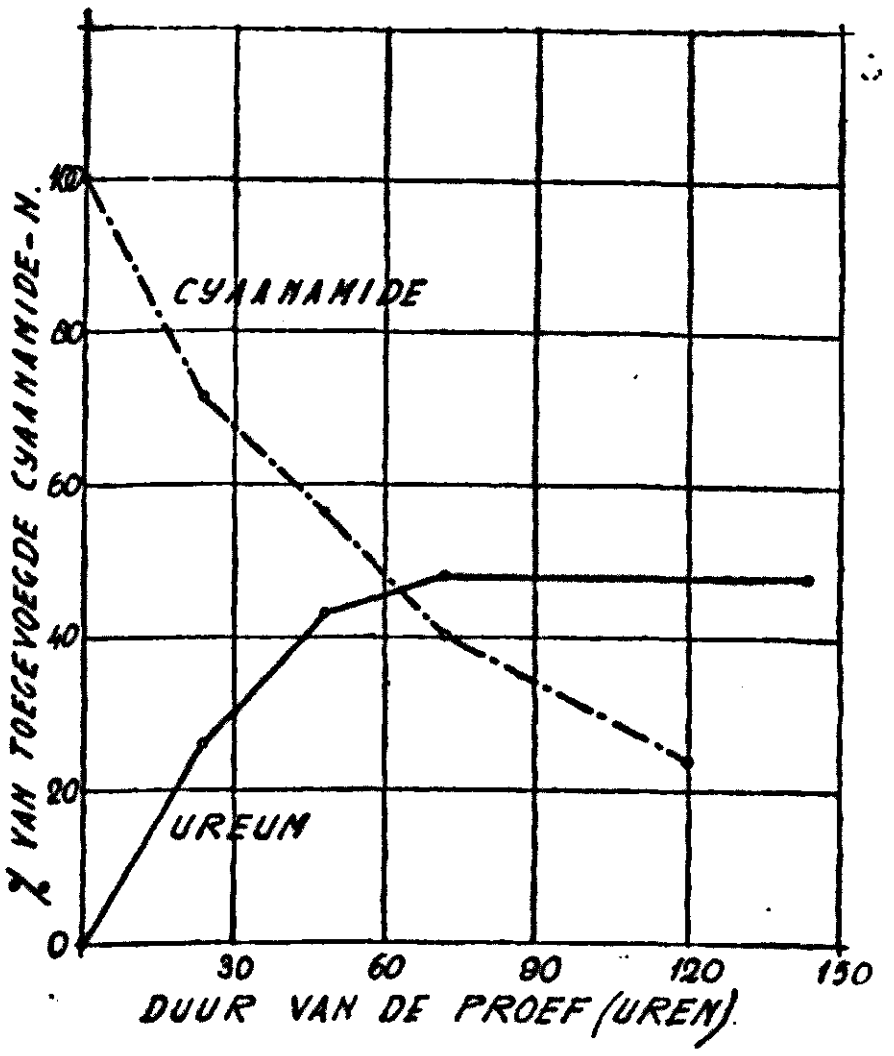



Fig. 11. Ureumvorming uit cyaanamide door het anorganische actieve materiaal van den, op 100 °C verhitten, grond L 32

Dat ook een veengrond, waarvan het adsorbeerende materiaal voor het grootste gedeelte uit organische stof zal bestaan, tot een zeer intensieve cyaanamidehydrolyse in staat is, blijkt uit de resultaten van de volgende proef.

*Proef 11*

Bij deze proef werden gebruikt:

veengrond WILNIS I, pH 3,1,
veengrond WILNIS II pH 4,3,
veengrond WILNIS III, pH 6,6.

Series van telkens 100 g veengrond werden, na bevochtigd te zijn, gedurende 2 × 1 uur op 100 °C gestoomd, waarna werd toegevoegd 10 cc van een kalkstikstofextract, dat per 10 cc bevatte:

11,5 mg totaal-N en
10,2 mg cyaanamide-N.

Na verschillende tijden werden bepaald:

cyaanamide (kwalitatief),
ureum en
ammoniak.

Resultaten in tabel 17.

TABEL 17

| analyses na | veengrond III | | | veengrond II | | | veengrond I | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ureum-N | ammo-niak-N | cyaan-amide-N | ureum-N | ammo-niak-N | cyaan-amide-N | ureum-N | ammo-niak-N | cyaan-amide-N |
| 12 h | 2,5 | 4,3 | – | – | – | – | – | – | – |
| | 3,7 | 4,8 | – | – | – | – | – | – | – |
| 36 h | 3,1 | 4,1 | + | 5,0 | 6,1 | (+) | 7,7 | 14,8 | 0 |
| | 3,8 | 5,2 | + | 6,9 | 5,3 | 0 | 6,4 | 15,4 | (+) |
| 60 h | 4,1 | 7,9 | (+) | 6,6 | 7,7 | 0 | 8,2 | 16,9 | 0 |
| | 4,0 | 8,2 | 0 | 7,1 | 8,2 | 0 | 8,1 | 16,7 | 0 |
| 84 h | 5,8 | 8,5 | – | 7,7 | 9,0 | – | – | – | – |
| | 4,9 | 10,6 | – | 7,5 | 8,7 | – | – | – | – |
| 108 h | – | – | – | – | – | – | 8,9 | 15,0 | – |

– beteekent: niet bepaald.

Na 36 uur is in veengrond (pH 3,1) ongeveer 7 mg ureum gevormd; bij pH 4,3 en 6,6 respectievelijk 6,0 en 3,5 mg. Na 60 uur zijn deze hoeveelheden achtereenvolgens 8,2; 6,8 en 4,0 mg. Het verschil tusschen de drie veengronden wordt gedurende de proef steeds minder duidelijk door de voortdurend toenemende ammoniakgehalten. Deze kunnen afkomstig zijn van de ureum doch ook van in den grond aanwezige N-verbindingen. Berekent men eenvoudigheidshalve de toenemende ammoniakgehalten als ureum, dan blijkt de cyaanamidehydrolyse in de drie veengronden niet zoo sterk uiteen te loopen als op grond van hun pH-cijfers verwacht mocht worden. Vergelijken we echter de omzettingssnelheden van het cyaanamide in den veengrond met die van den zandgrond L 32, dan valt onmiddellijk op, dat het aantal actieve oppervlakken in eerste instantie bepalend is voor de hydrolyse-snelheid. De invloed van de pH zal eerst in de tweede plaats merkbaar zijn.

Eveneens valt uit de proeven met veengrond af te leiden, dat de meening van COWIE (12), als zou de vorming van ureum uit cyaanamide niet plaats vinden in „peat and fen soils", onjuist is. Daar COWIE nagenoeg geen bijzonderheden bij zijn desbetreffende proef geeft is niet met zekerheid te zeggen waar de schoen wringt. Wanneer men echter de cijfers, die COWIE in verband met zijn proeven met „peat" en „fen soils" opgeeft, nader bekijkt, dan kan als eenige conclusie getrokken worden, dat cyaanamide door deze gronden wèl in ureum omgezet wordt. Alleen het bereikte ureumniveau is lager dan dat van de, ter vergelijking door COWIE aangehaalde, andere gronden. Het is mogelijk, dat hier de wijze van ureumbepaling invloed heeft gehad. COWIE bepaalt ureum niet in het grondpercolaat of -filtraat, doch in den vorm van ammoniak in den grond

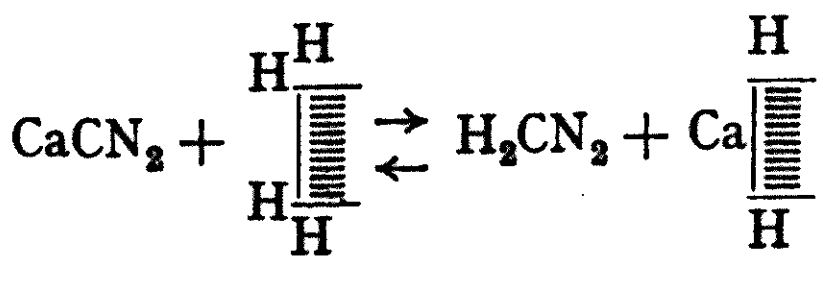
zelve. Hiertoe wordt urease aan den grond toegevoegd. Aangezien het enzym urease zeer gevoelig is voor een lage pH van het milieu, kan deze methode het eindresultaat eveneens beïnvloed hebben.

Het blijkt dus, dat zoowel het anorganische- als het organische adsorbeerende complex van den grond meewerkt bij de hydrolyse van cyaanamide tot ureum. Uit de onderzoekingen van KAPPEN (31) en STUTZER en REIS (78) volgt, dat óók de gehydrateerde sesquioxyden in staat zijn tot deze hydrolyse. Dat ook het door KAPPEN als actieve katalysator onderkende mangaandioxyde tot ureumvorming in staat is, verwondert ons niet, nadat we ons gerealiseerd hebben hoe deze verbinding, verkregen in zwavelzuur milieu, zich in een dispers systeem gedraagt. Het ultramikron $MnO_2$ is dan nl. omgeven door een electrische dubbellaag, waarvan de buitenste laag gevormd wordt door $H^+$-ionen (80). We kunnen dus de in de literatuur bekende katalysatoren voor de hydrolyse van cyaanamide tot ureum alle van één gezichtspunt uit beschouwen, nl. als verbindingen met colloïdale eigenschappen, waarbij in de buitenste laag van de dubbellaag de $H^+$-ionen òf overheerschen òf in bepaalde hoeveelheid aanwezig zijn.

## § 2. *Het chemisme van de omzettingen*

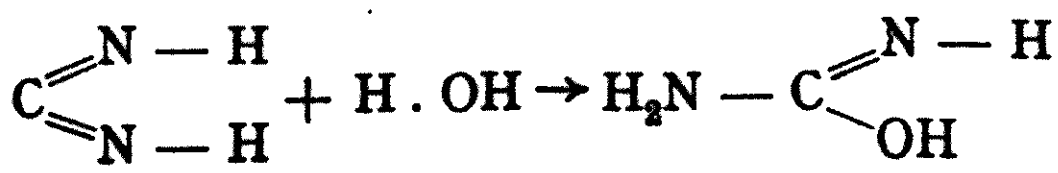
Uitgaande van de in de voorafgaande paragrafen verzamelde feiten kunnen we ons het chemisme van de cyaanamide-omzettingen als volgt voorstellen:

Wanneer het Ca-cyaanamide-molecuul ($CaCN_2$) terecht komt in de attractiesfeer van het adsorbeerende deeltje, heeft dit tot resultaat, dat door omwisseling van één $Ca^{++}$-ion tegen twee $H^+$-ionen, cyaanamide ontstaat, volgens:



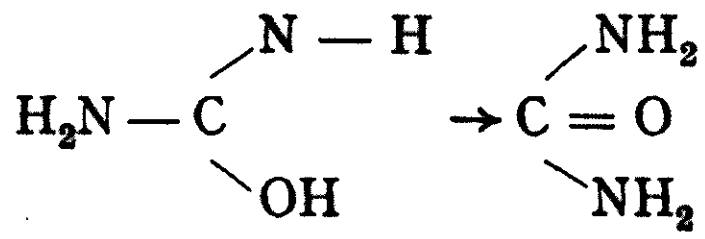
. . . . . (1)

Het cyaanamide-molecuul is, in de werkingssfeer van het actieve deeltje grensvlak, blootgesteld aan botsing met watermoleculen. De aanwezige $H^+$-ionen zijn door hun katalyseerend vermogen in staat, als resultaat van deze botsingen, cyaanamide te hydrolyseeren. Deze hydrolyse komt tot stand volgens:



. . . (2)

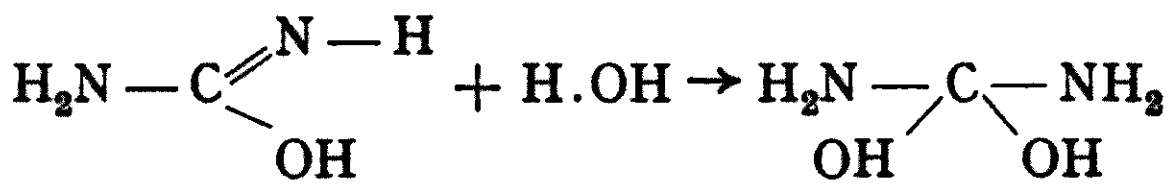
Vervolgens ontstaat door intramoleculaire omzetting, onder invloed van $H^+$-ionen, ureum:



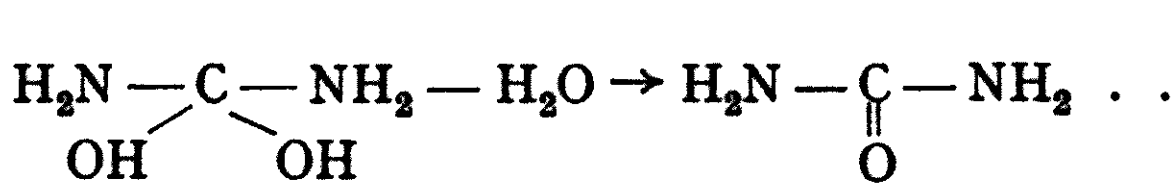
. . . . . (3)

Het aldus ontstane ureum valt dan, buiten de extractiesfeer van het grensvlak gekomen, ten prooi aan de ureumsplitsende bacteriën, waarbij het gehydrolyseerd wordt tot ammoniumcarbonaat.

Wanneer we geen intramoleculaire omzetting van het molecuul $H_2N-C{=}NH{-}OH$ aannemen, kan dit gehydrolyseerd worden volgens:

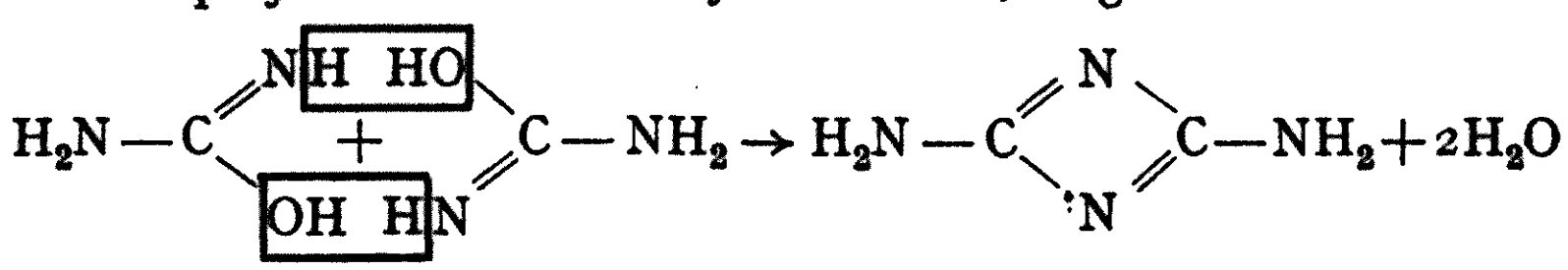


. . . . (3a)



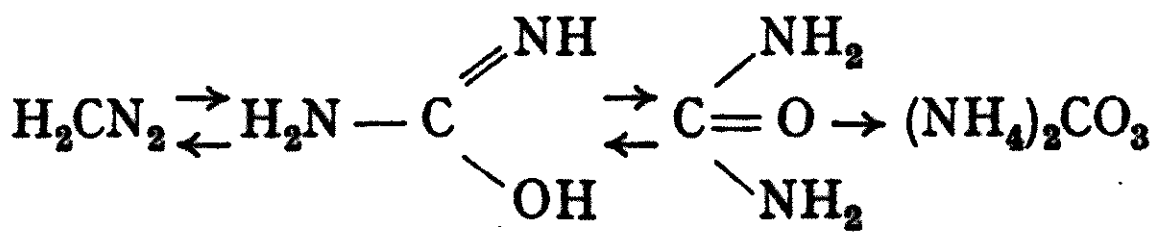
. . . . . (3b)

Het cyaanamide-monohydraat zal, onder bepaalde omstandigheden, kunnen polymeriseeren tot dicyaandiamide, volgens:



(4)

Dit heeft plaats, wanneer op een gegeven oogenblik de reactie:



niet via ammoniumcarbonaat naar rechts kan afloopen. Doordat zich dan op een gegeven oogenblik een evenwicht zal gaan instellen kan het cyaanamide polymeriseeren tot dicyaandiamide, al of niet via cyaanamide-monohydraat. Bij deze opvatting gaan we uit van de, min of meer speculatieve, veronderstelling, dat er alleen dicyaandiamide kan ontstaan uit cyaanamide bij aanwezigheid van voldoende $H^+$-ionen, indien er in de reactieketen een stagnatie (in dit geval bij de ureumafbraak) kan optreden. Dit geval deed zich voor bij onze omzettingsproeven met verhitten grond, waar het gevormde ureum opgehoopt werd. Hier vonden we (zelfs in het gunstigste geval van den H-grond met pH 3,5)

een ureumniveau van $\pm$ 70 %, terwijl geen cyaanamide meer aangetoond kon worden. Het ontstaan van dicyaandiamide werd in dit geval ook d.m.v. nitrificatieproeven aannemelijk gemaakt (zie ook blz. 22, 23). In den levenden grond zullen we (mits voldoende $H^+$-ionen aanwezig zijn) dus niet bang behoeven te zijn voor deze dicyaandiamidevorming, aangezien aldaar een ophooping van ureum, afgezien van extreme omstandigheden, tot de onmogelijkheden behoort.

Aan de hand van het voorgaande kunnen we voor de omzetting en afbraak van cyaanamide tot de ammoniakphase het volgende schema ontwerpen:

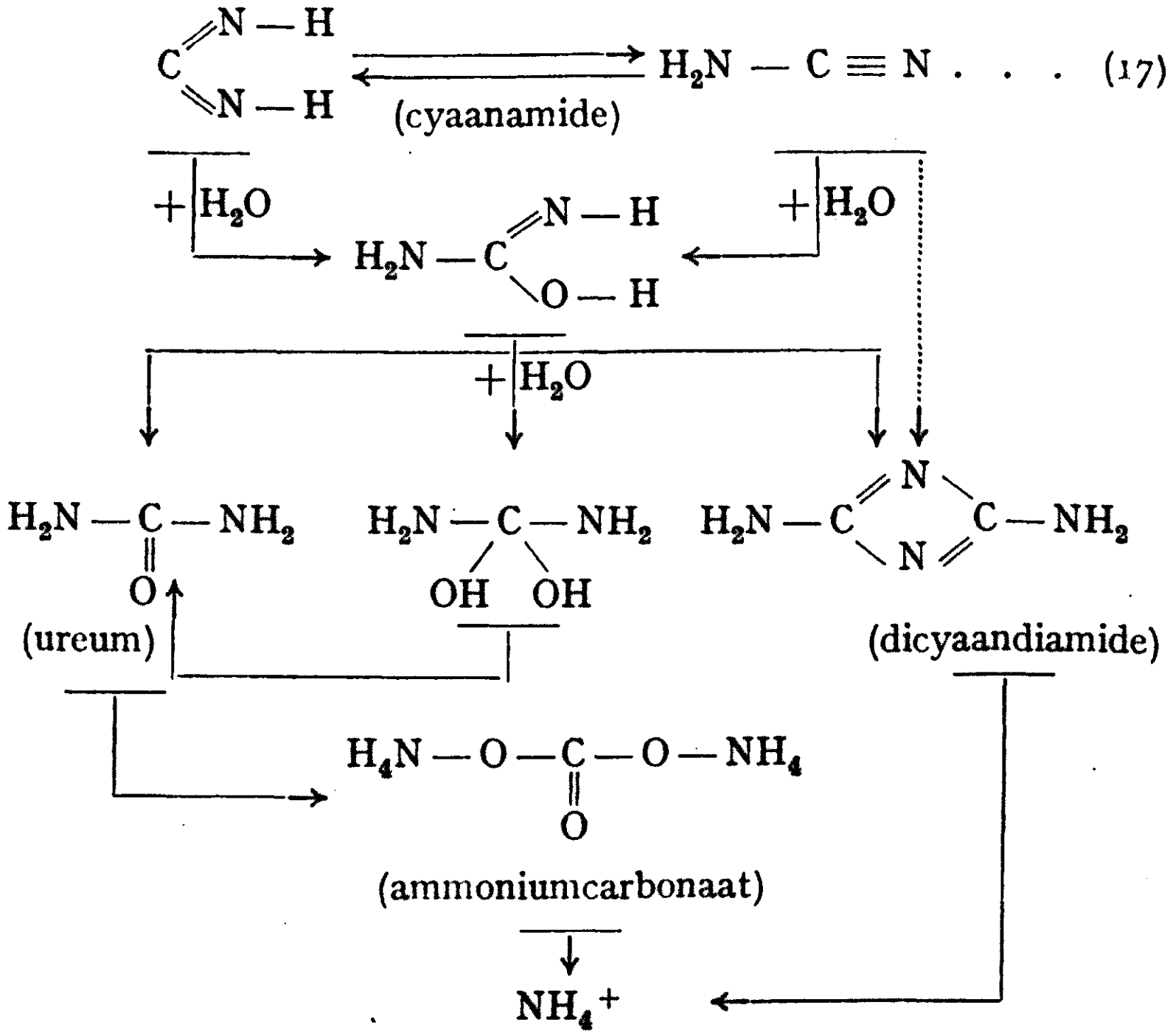
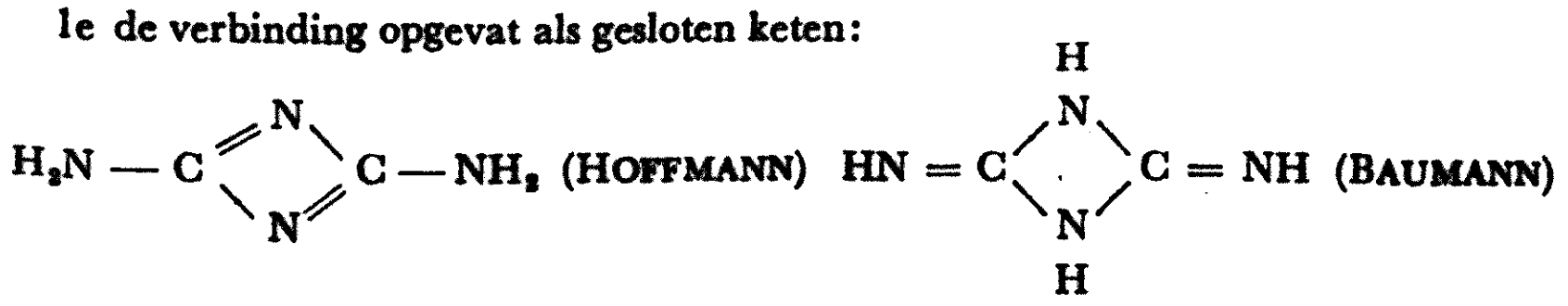


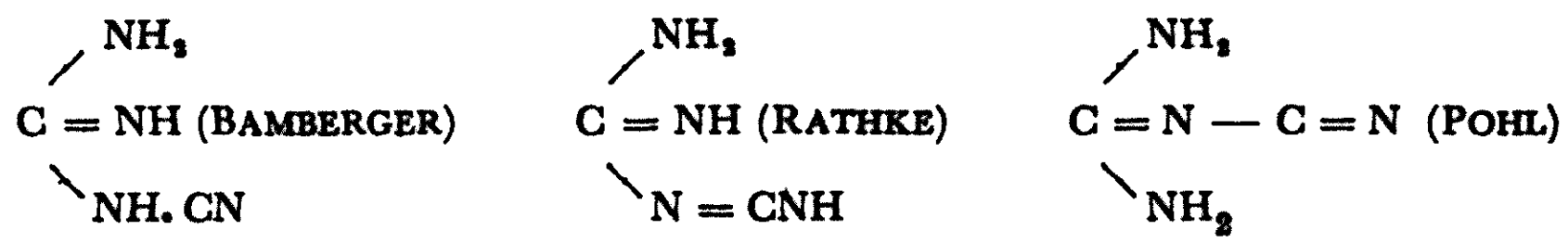

Fig. 12. Schema van de omzettingen en de afbraak van cyaanamide

Bij dit schema kan opgemerkt worden dat het, t.a.v. de polymerisatiemogelijkheid van cyaanamide tot dicyaandiamide waarschijnlijk een vereenvoudigd beeld van de werkelijkheid geeft. Voor dicyaandiamide worden in de literatuur verschillende structuurformules aangegeven, b.v. (11):

1e de verbinding opgevat als gesloten keten:



2e de verbinding als open keten:




Volgens KAUFFUNGEN (34) en TAUSS (79) zijn de open-keten-formules van RATHKE en BAMBERGER het waarschijnlijkst.

In de onderzoekingen van GRUBE en KRÜGER (22), MORELL en BURGEN (52) en HETHERINGTON en BRAHAM (24) wordt naar voren gebracht, dat de polymerisatie, die volgens eigen waarnemingen reeds bij het bewaren van de kristallen van het zuivere cyaanamide bij kamertemperatuur aan de lucht plaats heeft en in waterige oplossing gestimuleerd wordt door zwakke basen, tot stand komt door het reageeren van één cyaanamide-ion met één ongedissocieerd molecuul volgens:

$$'H - N - C \equiv N + H_2N - C \equiv N \rightarrow C_2N_2N_2H_3' \quad . \; . \; . \quad (79)$$

Bij deze beschouwingswijze gaat men uit van de ionisatie van het zwakke zuur $H_2CN_2$. Nu reageert het zuivere handelspreparaat van dicyaandiamide als een neutrale verbinding, het vormt met metalen geen zouten en het wordt in den grond nagenoeg niet in ammoniak omgezet. Van dit preparaat kunnen we ons al heel moeilijk het bestaan van den ionvorm denken, zooals in de hierboven aangegeven reactievergelijking tot uitdrukking komt. Daartegenover staat, dat het bij kamertemperatuur uit het cyaanamide ontstaande polymerisatieproduct wèl een in water onoplosbaar zout met het zilverion vormt en in den grond (waarschijnlijk) wèl, zij het langzaam, geammonificeerd wordt. Voor deze laatste verbinding kan men de formule van BAMBERGER of RATHKE wèl aannemen. Weinig is met zekerheid bekend over deze kwestie, zoodat het niet uit te maken is of het veronderstellen van twee vormen van dicyaandiamide juist is. Bij ons eigen onderzoek konden we evenmin de vraag oplossen, welke dicyaandiamideverbinding in den verhitten grond ontstond.

Daar uit de literatuur geen eensluidende meening over het chemisme van de dicyaandiamidevorming naar voren komt, meenden we gerechtigd te zijn in het omzettingsschema een bepaalde zienswijze naar voren te mogen brengen.

T.a.v. de snelheid der verschillende in het schema aangeduide reacties geldt, dat de polymerisatiereacties langzamer tot stand komen dan de hydrolyse, terwijl de biochemische hydrolyse van de gevormde ureum weer met grooter snelheid plaats heeft dan de ammonificatie van het dicyaandiamide. Met opzet is in het voorgaande afgezien van de o.m. door HETHERINGTON en BRAHAM (24) waargenomen ureumvorming uit cyaanamide in een oplossing met een pH van 9–10 en hooger. Deze komt echter zeer langzaam tot stand (zie tabellen 10 en 11 op blz. 28). In 't bijzonder bij pH 14 nemen genoemde auteurs aan, dat de hydrolyse van het cyaanamide in dit geval tot stand komt onder katalytischen invloed van $OH^-$-ionen. De vele literatuurgegevens wijzen op een gecompliceerd omzettingsmechanisme van cyaanamide dat sterk beïnvloed wordt door de verhouding van $OH^-$- en $H^+$-ionen in het omzettingsmedium. Bij

50 °C is de polymerisatie in buffermengsels te verwaarloozen bij pH's < 7. Boven pH 8 neemt ze snel in intensiteit toe. Het maximum ligt bij pH 9,6, waarna een snelle daling volgt tot pH 11–12. In onze cultuurgronden zal dus, wanneer plaatselijke ophoopingen van de meststof vermeden worden, bij bemesting van den grond met kalkstikstof niet gevreesd behoeven te worden voor dicyaandiamidevorming. HETHERINGTON en BRAHAM vinden een maximum in de dicyaandiamidevorming bij pH 13 Ureumvorming treedt weer op boven pH 10, terwijl bij pH 14 dicyaandiamidevorming nagenoeg niet meer voorkomt. Intusschen is nog niet uitgemaakt bij welke suspensie-pH de ureumvorming geheel of gedeeltelijk plaats moet maken voor dicyaandiamidevorming.

De hydrolyse van cyaanamide in grond vertoont eenige overeenkomst met de door RICE en OSUGI (66) beschreven inversie van rietsuiker door grond. Deze inversie komt eveneens tot stand onder den katalyseerenden invloed van de aan het actieve materiaal gebonden $H^+$-ionen. Of er volledige paralleliteit tusschen beide processen bestaat is aan de hand van de desbetreffende literatuur niet uit te maken. PALLMANN vond, dat de suikerinversie in monodisperse, niet gecoaguleerde, systemen bepaald wordt door de electrometrisch bepaalde $H^+$-ionenconcentratie, m.a.w. de inversie verliep hetzelfde, of het proces nu plaats vond in een buffermengsel van bepaalde pH of in een dispers systeem van denzelfden zuurtegraad. De overeenkomst tusschen de electrometrische $C_H$ en de waterstofionenconcentratie, berekend uit de gemeten inversie, was in deze gevallen treffend. Dit deed aanvankelijk de gedachte post vatten als zou de suikerinversie anders tot stand komen dan de cyaanamidehydrolyse, die blijkens onze waarnemingen in een dispers-systeem plaats vindt bij een lagere pH dan de electrometrisch bepaalde. PALLMANN vond echter, werkend met gekoaguleerde monodisperse systemen, een veel hoogere $H^+$-ionenconcentratie, berekend uit de waargenomen inversie, dan die aangegeven door de electrometrische meting. De suikerinversie bleek in dit geval dus niet door de $C_{H(e)}$ bepaald te worden, maar door een veel hoogere concentratie. Daar de grond gezien moet worden als een polydispers systeem dat, na sterilisatie op 100 of 115 °C, ook als gecoaguleerd mag worden beschouwd, en hierbij eveneens de $H^+$-invloed grooter was dan de gemeten $C_H^e$, kunnen we aannemen, dat er een zekere overeenstemming bestaat tusschen de hydrolyse van suiker en die van cyaanamide. Er is echter ook een verschil tusschen beide processen. De rietsuikerinversie komt alleen bij aanwezigheid van $H^+$-ionen met merkbare snelheid tot stand. Bij alkalische, zelfs bij neutrale reactie van het inverteerende milieu is de inversiesnelheid practisch gelijk nul (56). Cyaanamide wordt niet alleen bij aanwezigheid van waterstofionen gehydrolyseerd, doch ook bij pH 14, wanneer zich in de oplossing nagenoeg geen waterstofionen meer bevinden, heeft hydrolyse tot ureum plaats.

## § 3. *Critische beschouwingen over enkele misvattingen omtrent de omzettingen en afbraak van cyaanamide in den grond*

Het beschouwen van de afbraak van cyaanamide tot ammoniak als één proces bracht o.a. LÖHNIS (43) tot de gedachte, dat het als biologisch beschouwd moest worden. ULPIANI (13) toonde echter al spoedig aan, dat bepaalde, ook in den grond voorkomende, bestanddeelen zonder de medewerking van micro-organismen in staat waren cyaanamide tot ureum te hydrolyseeren. KAPPEN (30) onderzocht hierna de werking van de hydroxyden van het ook in den grond voorkomende Fe en Mn. Hij kon een snelle verdwijning van cyaanamide waarnemen in een steriele oplossing, waaraan de eveneens steriele katalysatoren waren toegevoegd. Ureum kon (alhoewel op een naar onze huidige opvattingen weinig exacte wijze) aangetoond worden als reactieproduct. Door deze waarnemingen van KAPPEN heeft, voornamelijk via de Duitsche literatuur, de meening vasten voet gekregen, als zouden de hydroxyden van Fe en Mn aansprakelijk zijn voor de physisch-chemische hydrolyse van cyaanamide tot ureum in den grond. Verschillende onderzoekers gingen nu na of een toevoeging van genoemde katalysatoren aan grond bij pot- en veldproeven leidden tot hoogere opbrengsten van het gebruikte proefgewas. Dit bleek niet het geval te zijn (23, 42). Dit was ook niet te verwachten, daar een cultuurgrond in 't algemeen een voldoende hoeveelheid katalyseerend materiaal bevat om de bij een kalkstikstofbemesting gebruikelijke hoeveelheid cyaanamide in ureum om te zetten (38).

Alhoewel latere onderzoekers [KUBIENA (38), WIENHUES (87)] aantoonden, dat de gehydrateerde sesquioxyden in te kleine hoeveelheden voorkomen in de gronden, die toch een snelle afbraak van cyaanamide te zien geven, terwijl tevens betwijfeld mag worden of ze in colloïdalen vorm in de Europeesche cultuurgronden in voldoende hoeveelheid zullen voorkomen, bleef de zienswijze van KAPPEN tot op den huidigen dag bestaan. Ook al door het ontbreken van bewijzen van de onvolledigheid ervan.

Nadat onderzoekers te Rothamsted (13, 54) nog eens den nadruk hadden gelegd op de drieledigheid van het afbraakproces van cyaanamide in den grond en COWIE (12) besluit, dat de hydrolyse van cyaanamide een physisch-chemisch proces van het adsorptie-type is, valt onze aandacht t.o.v. het benoodigde katalysatormateriaal op het colloïdaal-actieve complex van den grond als geheel. Dus zoowel op het anorganische- als op het organische gedeelte daarvan, terwijl eveneens de eventueel aanwezige colloïdale sesquioxyden hun steentje tot de omzetting zullen kunnen bijdragen. Hierbij valt dus den nadruk niet meer op een bepaald gedeelte van het materiaal met oppervlakte-activiteit, doch, nogmaals gezegd, op het actieve oppervlak als zoodanig, afgezien van het materiaal, dat het

actieve oppervlak levert. Het feit, dat prehnit (12), kleimineralen (13), beenderkool (65), norit en dusarit eveneens goede katalysatoren zijn bij de hydrolyse van cyaanamide is een steun voor onze opvatting.

Niettegenstaande dit alles, waardoor aan het onderzoek o.i. een bepaalde richting wordt gewezen, verschijnt SCHMALFUSZ (71) weer met de oude veronderstelling, dat de micro-organismen in den grond in de eerste plaats cyaanamide tot ureum hydrolyseeren. De physisch-chemische hydrolyse kan en wil SCHMALFUSZ niet wegcijferen; maar deze komt toch volgens hem in den grond in de tweede plaats in aanmerking. Zonder uitgebreid eigen onderzoek was het niet mogelijk de juistheid of onjuistheid van deze bewering na te gaan. Ondertusschen is in het voorgaande gebleken, dat de micro-organismen bij de omzetting van cyaanamide in ureum in den grond geheel gemist kunnen worden. Wij meenen dan ook, dat de theorie van SCHMALFUSZ onjuist genoemd kan worden. In het volgende zullen we aantoonen, dat de zienswijze van SCHMALFUSZ ook nog zeer onvoldoende gesteund wordt door het experiment en op verkeerd geïnterpreteerde waarnemingen berust. Deze critiek lijkt ons temeer gewenscht, omdat de theorie door SCHMALFUSZ' leerling WIENHUES als juist verder werd uitgedragen. WIENHUES komt dan ook, op dezen grondslag, in zijn werk niet alleen tot foutieve conclusies, maar ook is door zijn werk de nevel rondom het kalkstikstofvraagstuk, die na de publicaties van Rothamsted langzaam optrekkende was, weer dichter geworden.

Enkele punten van critiek op het werk van SCHMALFUSZ (71) willen we nader belichten:

1e Behandelt SCHMALFUSZ in zijn publicatie de resultaten van de onderzoekingen te Rothamsted „en bagatelle", ofschoon ze met de eigen conclusies geheel in tegenspraak zijn.

2e Berust de conclusie, dat de physisch-chemische ureumvorming in den grond kwantitatief minder belangrijk is dan de bacteriologische, op één proefneming, die geheel onvoldoende van opzet is, zooals uit tabel 18 moge blijken.

SCHMALFUSZ analyseerde den met cyaanamide bemesten grond na drie dagen. Uit ons eigen onderzoek is gebleken, dat het omzettingsproces alleen goed te volgen is, wanneer men den grond op cyaanamide en haar reactieproducten onderzoekt met tijdsintervallen, die niet grooter zijn dan 24 uur. Bovendien blijkt uit de in gronden Merzalben en Köthen gevonden ureumcijfers duidelijk een physisch-chemische hydrolyse van het cyaanamide. Overigens staat deze tabel geen conclusies, in welke richting ook, toe.

3e Gaan we na op welke wijze SCHMALFUSZ verder tot zijn theorie komt, dan blijkt het, dat hij het verdwijnen van cyaanamide waarneemt in cultuurvloeistoffen, die geënt werden met verschillende bacteriën en schimmels in reincultuur. Zie tabel 19.

TABEL 18 *Afbraak van cyaanamide in verschillende, verhitte gronden. Toegevoegd 15 mg cyaanamide-N. N in mg per 100 g grond*

| analyses na dagen | grond | extract in | pH($H_2O$) | totaal-N | cyaanamide-N | ureum-N | ammoniak-N |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 | Dahlem | KCl | – | 14,1 | 13,5 | 2,3 | 2,6 |
| 5 | | $H_2O$ | 6,4 | 19,6 | 1,9 | 4,0 | 1,7 |
| 3 | Merzalben | KCl | – | 21,7 | 6,3 | 8,7 | 3,1 |
| 5 | | $H_2O$ | 5,1 | 17,6 | 2,2 | 11,1 | 1,2 |
| 3 | Köthen | KCl | – | 22,7 | 9,3 | 2,0 | 3,2 |
| 5 | | $H_2O$ | 7,6 | 19,6 | 0,0 | 11,0 | 0,6 |
| 3 | Oderbruch | KCl | – | 33,0 | 4,5 | 0,0 | 6,4 |
| 5 | | $H_2O$ | 5,7 | 28,0 | 0,0 | 3,8 | 1,2 |

TABEL 19

| per 100 cc cultuur-vloeistof | cultuur van | proef-duur dagen | pH | schim-mel-bact.-N | totaal-N cultuur-vloeistof | ammo-niak-N | ongeënt na 20–23 dagen | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | totaal-N | cyaana-mide-N | pH |
| 10 cc kalk-stikstof-extract | 1 Bll. spec. | 7 | 6,35 | 1,1 | 6,5 | 0,0 | | | |
| | | 20 | 6,17 | 4,7 | 3,2 | 0,2 | | | |
| | 2. Bm. pyocyaneum | 7 | 4,37 | 2,7 | 4,9 | 0,2 | | | |
| | | 20 | 4,25 | 2,8 | 5,7 | 0,2 | 7,6 | 7,1 | 5,9 |
| | 3. Asp. niger | 7 | 3,16 | 6,8 | 0,9 | 0,3 | | | |
| | | 20 | 3,16 | 6,8 | 1,2 | 0,3 | | | |
| | 4. Asp. fumigatus | 7 | 4,21 | 6,2 | 1,4 | 0,3 | | | |
| | | 20 | 4,62 | 5,9 | 1,5 | 0,2 | | | |
| 20 cc kalk-stikstof-extract | 1. Bll. spec. | 7 | 6,49 | 2,4 | 12,6 | 0,0 | | | |
| | | 20 | 6,16 | 7,1 | 7,7 | 0,7 | | | |
| | 2. Bm. pyocyaneum | 7 | 4,96 | 8,1 | 6,5 | 0,2 | | | |
| | | 20 | 4,25 | 8,0 | 5,7 | 0,3 | | | |
| | 3. Asp. niger | 7 | 4,79 | 13,4 | 0,9 | 0,2 | 14,7 | 13,7 | 6,2 |
| | | 17 | 4,76 | 12,8 | 1,7 | 0,3 | | | |
| | 4. Asp. fumigatus | 7 | 4,54 | 11,6 | 2,8 | 0,1 | | | |
| | | 23 | 6,05 | 9,9 | 5,2 | 0,3 | | | |
| 40 cc kalk-stikstof-extract | 1. Bll. spec. | 7 | 6,70 | 3,0 | 27,6 | 5,4 | | | |
| | | 20 | 6,30 | 11,5 | 18,2 | 6,8 | | | |
| | 2. Bm. pyocyaneum | 7 | 5,90 | 14,3 | 15,9 | 0,6 | | | |
| | | 20 | 4,86 | 22,7 | 6,9 | 0,2 | | | |
| | 3. Asp. niger | 7 | 3,58 | 14,1 | 14,7 | 2,4 | 29,4 | 28,7 | 6,2 |
| | | 17 | 6,35 | 19,5 | 10,4 | 4,1 | | | |
| | 4. Asp. fumigatus | 7 | 6,17 | 6,1 | 23,7 | 2,1 | | | |
| | | 23 | 3,95 | 24,3 | 5,2 | 0,3 | | | |

naar SCHMALFUSZ

Nu is met deze proef nog niet aangetoond, dat de verdwijning van het cyaanamide gepaard gaat met het ophoopen van ureum, noch het bewijs geleverd van ureumvorming uit cyaanamide door micro-organismen, zelfs niet naar aanleiding van een waargenomen vermeerdering van het ammoniakgehalte in de cultuurvloeistof, uitgezonderd misschien bij 40 cc kalkstikstofextract geënt met *Bac. species* en *Aspergillus fumigatus*.

Uit een volgende proef blijkt het SCHMALFUSZ evenwel, dat de schimmel *Aspergillus niger* in staat is in opmerkelijke hoeveelheden ureum te maken in een cultuurvloeistof, die naast glucose als C-bron, cyaanamide als N-leverend bestanddeel bevat. Het bestaan van deze biologische ureumvorming uit cyaanamide is onmiskenbaar. Door ons kon ze ook bevestigd worden. Het is echter bij nadere beschouwing van de door ons tot nu toe verzamelde gegevens duidelijk, dat de eindconclusie van SCHMALFUSZ naar aanleiding van de door hem verrichte proeven, onjuist is.

In het volgende hoofdstuk zal getracht worden een antwoord te geven op de vraag, in hoeverre de biochemische krachten in den grond een rol kunnen spelen bij de omzetting cyaanamide-ureum.

## HOOFDSTUK V

# GEDRAG VAN MICRO-ORGANISMEN UIT DEN GROND T.O.V. CYAANAMIDE

### § 1. *De vorming van ureum uit cyaanamide door verschillende micro-organismen*

Nadat MAZÉ en LEMOIGNE (50) gevonden hadden dat er micro-organismen zijn, die cyaanamide in ureum om kunnen zetten, legt SCHMALFUSZ nog eens den nadruk op deze eigenschap.

SCHMALFUSZ ent in een cultuurvloeistof met glucose, zouten en kalkstikstofextract (± 30 mg cyaanamide-N per 100 cc cultuurvloeistof) enkele, ook in den grond voorkomende micro-organismen in reincultuur. Afhankelijk van de hoeveelheid glucose die gegeven werd, neemt SCHMALFUSZ na eenigen tijd bebroeden een meer of minder snel verdwijnen van het cyaanamide waar. Het ontstaan van ureum als omzettingsproduct wordt echter niet aangetoond! Uit zijn proefresultaten (zie tabel 19 op blz. 46) is te concludeeren, dat een niet nader beschreven *Bacillus species*, *Bm. pyocyaneum* en *Aspergillus niger* bij opklimmende cyaanamideconcentraties verschillende hoeveelheden N vastleggen (tabel 20).

TABEL 20

| toegevoegd aan cyaanamide-N | N-vastlegging door | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Bll. species | | Bm. pyocyaneum | | Asp. niger | |
| | na 7 dgn | na 20 dgn | na 7 dgn | na 20 dgn | na 7 dgn | na 20 dgn |
| 7,1 mg . . . . | 1,1 | 4,7 | 2,7 | 2,8 | 6,8 | – |
| 13,4 „ . . . . | 2,1 | 7,1 | 8,1 | 8,0 | 13,4 | – |
| 28,7 „ . . . . | 3,0 | 11,5 | 14,3 | 22,7 | 14,1 | – |

naar SCHMALFUSZ

In de snelheid van cyaanamide-N-assimilatie is dus tusschen de verschillende micro-organismen wel eenig onderscheid, evenals in de laatstelijk opgenomen hoeveelheid stikstof. Met deze proeven werd dus alleen aangetoond, dat er micro-organismen zijn, die onder gunstige groeivoorwaarden de N van cyaanamide voor den opbouw van hun lichaamseiwitten kunnen gebruiken. Het bewijs van een eventueele ureumvorming en -uitscheiding als dissimilatieproduct is echter in deze proeven niet te vinden.

Wanneer SCHMALFUSZ, verder werkende met *Aspergillus niger*, waarneemt, dat de in de cultuurvloeistof achtergebleven N niet correspondeert met de hoeveelheid cyaanamide- + dicyaandiamide-N, denkt hij onmiddellijk aan ureum als dissimilatieproduct.

Entte SCHMALFUSZ *Aspergillus niger* in de reeds genoemde cultuurvloeistof met resp. 15 en 30 mg cyaanamide-N, dan vond hij na eenige dagen het volgende (tabel 21):

TABEL 21

*Ureumvorming uit cyaanamide door Aspergillus niger in cultuurvloeistof*

| cultuur met Asp. niger | proefduur in dagen | pH | totaal-N in oplossing | schimmel-N | cyaanamide-N | ureum-N |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Met 15 mg cyaanam.-N | 3 | 4,1 | 13,2 | 2,6 | 8,3 | 5,3 |
| | 5 | 4,2 | 6,3 | 8,7 | 0,0 | 5,6 |
| Steriele contrôle | 6 | 6,2 | 15,8 | – | 15,3 | 0,0 |
| Met 30 mg cyaanam.-N | 3 | 6,0 | 29,6 | 0,8 | 18,5 | 11,5 |
| | 5 | 5,9 | 26,2 | 4,4 | 2,6 | 23,4 |
| Steriele contrôle | 6 | 6,3 | 30,6 | – | 30,3 | 0,0 |

naar SCHMALFUSZ

Trekken we onze conclusies uit deze proefresultaten, dan valt het op, dat *Aspergillus niger* inderdaad in staat is ureum te maken uit cyaanamide. In de steriele contrôle (niet geënte kolf) was immers na zes dagen nog geen ureum aan te toonen. Opvallend is het verschil bij lagere en hoogere concentratie. Het blijkt, dat de schimmel bij de hoogste concentratie minder goed groeide dan bij de lagere, hetgeen duidelijk tot uiting komt in de cijfers, die de door de schimmel vastgelegde N- aangeven en in de pH-cijfers. Het cyaanamidegehalte is echter, indien 30 mg cyaanamide-N gegeven werd, in vergelijking met de gift van 15 mg veel sterker afgenomen ten gunste van het ureum. Dit komt tot uiting in de verhouding ureum-N : schimmel-N. Deze was bij 30 mg per 100 cc cultuurvloeistof ongeveer 5,3 : 1, bij 15 mg per 100 cc 0,6 : 1. Hieruit is te concludeeren, dat de hooge gift waarschijnlijk minder goed door de schimmel wordt verdragen dan de lage. Dit is te herleiden tot de reeds eerder genoemde giftige eigenschap van het cyaanamide. Wèl is het schimmelweefsel, zelfs bij veel slechteren groei, bij de gift van 30 mg in staat een zeer hoog percentage van het in de cultuurvloeistof aanwezige cyaanamide in ureum om te zetten (zie tabel 20). Dit zou, in verband met den zooveel slechteren groei van de schimmel bij 30 mg cyaanamide-N wijzen op een soort „afweer" van het hyphenweefsel, om zich te ontdoen van

het giftige cyaanamide. SCHMALFUSZ neemt dan ook aan, dat *Aspergillus niger* allereerst het cyaanamide in ureum verandert, pas daarna de gevormde ureum in eiwitten. Deze opvatting wordt door hem nog eens aannemelijk gemaakt door de volgende proef, waarbij aan de reeds eerder genoemde cultuurvloeistof naast 30 mg cyaanamide-N eveneens 15 mg ureum-N werd toegevoegd. Daarna werd de vloeistof geënt met conidiën van *Aspergillus niger*. In tabel 22 vindt men de resultaten van deze proef na vijf en zes dagen staan bij 35 °C.

TABEL 22

*Ureumvorming door Aspergillus niger in cultuurvloeistof met cyaanamide en ureum*

| proefduur in dagen | pH | totaal-N vloeistof | organische N | cyaan-amide-N | ureum-N | ammoniak-N |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 5,43 | 44,6 | 0,4 | 21,6 | 21,3 | 1,0 |
| 6 | 4,52 | 41,6 | 2,7 | 2,0 | 39,5 | 0,0 |
| steriele contrôle 6 | 6,17 | 45,6 | – | 29,9 | 15,5 | – |

naar SCHMALFUSZ

Er is dus een verhooging van het ureumgehalte waar te nemen, die grooter wordt naarmate méér schimmelmassa gevormd wordt. De ureumvorming is dus het resultaat van een kracht uitgaande van het schimmelweefsel, aangezien volgens, door ons bevestigde, proeven van SCHMALFUSZ de invloed van de pH-verlaging in het medium als gevolg van de stofwisseling van de schimmel zonder invloed is op de hydrolyse van cyaanamide tot ureum. Als mogelijke katalyseerende krachten, in- of uitgaande van het schimmelweefsel, komen voor deze ureumvorming in aanmerking:

1. een (of meer) enzym(en) of anorganische katalysator(en). In beide gevallen is het bestaan van een endo- of ectovorm mogelijk.
2. een physisch-chemische kracht gebonden aan het oppervlak van de hyphenmassa, analoog aan het gebeuren in grond en in mengsels van kwartszand met norit, prehnit, dusarit, etc. De zich aan de hyphen in geïoniseerden vorm bevindende $H^+$-ionen zouden in dit geval de hydrolyse van cyaanamide tot ureum katalyseeren.

SCHMALFUSZ veronderstelt bij *Aspergillus niger* een enzymcomplex, dat de besproken omzetting tot stand brengt. Hij slaagt er echter niet in het bestaan van een dergelijk complex aan te toonen. Wèl vindt hij, dat het hierbij in elk geval niet gaat om een ecto-enzym, hetgeen KAPPEN (33) eveneens aantoonde.

Het leek ons gewenscht dit interessante vraagstuk aan een nader onderzoek te onderwerpen. De oorlogshandelingen sedert September 1944

verhinderden ons echter de in dit verband gestelde vragen alle te beantwoorden. Slechts enkele aanwijzingen werden verkregen.

Allereerst konden wij bevestigen dat *Aspergillus niger* in een milieu met cyaanamide ureum vormt. Bij de hier besproken proeven werd door ons ongeveer op dezelfde wijze gewerkt als SCHMALFUSZ dit deed.

*Proef 12*

100 cc cultuurvloeistof [MULDER (55)] + 20 cc kalkstikstofextract [1]) (geneutraliseerd met $CO_2$) werden geënt met *Aspergillus niger*. Weggezet bij 30 °C.

Van tijd tot tijd werd in de oplossing nagegaan het cyaanamide-, ureum- en ammoniakgehalte.

*Opmerking*. Door de abusievelijk te hoog ingestelde pH van de cultuurvloeistof (pH 8,3) begon de groei pas na 3–4 dagen waarneembaar te worden. Op de meeste kolven was na 5 dagen nog geen aaneengesloten schimmeldek te zien — op dit moment vrijwel ook nog geen conidiënvorming. Na 8–9 dagen begon deze laatste goed door te zetten.

Resultaten in tabel 23.

TABEL 23

*Omzetting van cyaanamide in ureum door Aspergillus niger*

| duur van de proef | totaal-N cultuurvloeistof | pH | N in mg per 120 cc vloeistof | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | cyaanamide-N | ureum-N | ammoniak-N | organische-N |
| 0 dagen | 28,4 | 8,3 | 25,8 | 2,0 | – | – |
| 5 „ | I – | 4,2 | – | 11,2 | 3,0 | – |
| | II – | 5,6 | – | 15,4 | 2,3 | – |
| 7 „ | I 25,3 | 4,0 | – | 18,6 | 2,9 | 1,7 |
| | II 24,6 | 4,0 | 7,3 | 14,4 | 2,8 | 2,0 |

De te hoog ingestelde pH van de cultuurvloeistof geeft ons de gelegenheid, bij beschouwing van de gevonden ureumcijfers, een inzicht te krijgen in de sterkte van de van het schimmelweefsel uitgaande katalyseerende kracht. Zelfs de na 5 dagen nog zeer kleine hyphenmassa is in staat geweest groote hoeveelheden ureum te vormen. Het katalyseerende agens is dus zeer krachtig.

*Proef 13*

Van een op gelijke wijze als de vorige opgezette proef werden alle schimmeldekken, na wegschenken van de onderstaande vloeistof, zorg-

[1]) Het extract bevatte ongeveer 25 mg cyaanamide-N.

vuldig met aq. dest. gedurende 1-2 uur uitgeloogd en hierna met schoon water nog eenige malen goed afgespoeld. Hierdoor werd bereikt, dat alle resten van de voormalige cultuurvloeistof verdwenen waren, zoodat verder groeien van het hyphenweefsel (in een C-vrij milieu) niet mogelijk is.

Onder de zich nog in de erlenmeyers bevindende, aldus gereinigde schimmeldekken, werd geschonken:

100 cc steriel water,
20 cc steriel kalkstikstofextract (pH 4,5-5) (= ± 25 mg cyaanamide-N),
5 cc toluol.

Door de toevoeging van toluol worden groei en infectie definitief voorkomen.

De aldus toebereide kolven werden weggezet bij 30 °C. Na bepaalden tijd staan werden het ureum- en ammoniakgehalte van de vloeistof bepaald.

Resultaten in tabel 24 (fig. 13).

Uit de hier weergegeven ureumcijfers blijkt, dat de ureumvorming zelfs onder invloed van het niet-groeiende schimmelweefsel zeer snel verloopt.

De schommelende ammoniakcijfers spreken een minder duidelijke taal. Waarschijnlijk zijn ze het resultaat van het vrijkomen van verschillende (kleine) hoeveelheden ammoniak door meer of minder vergevorderde autolyse van het hyphenweefsel.

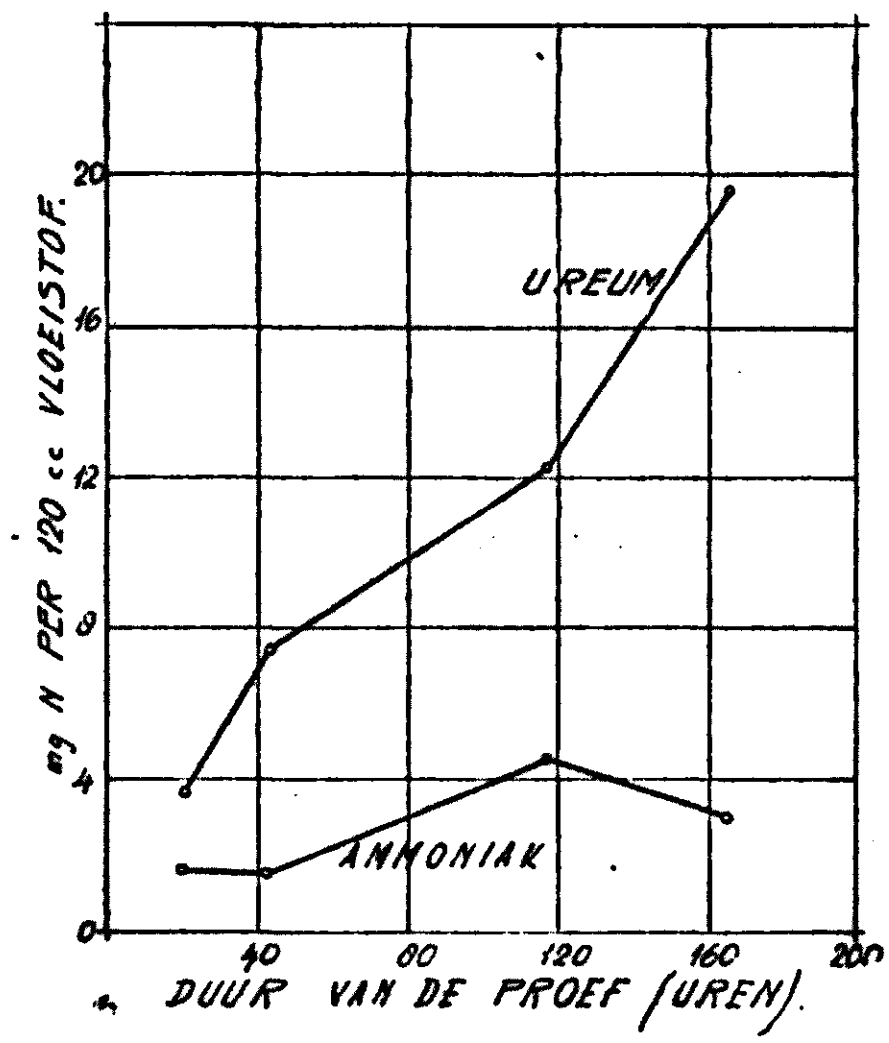



Fig. 13. Omzetting van cyaanamide in ureum door *Aspergillus niger*

TABEL 24

*Ureumvorming uit cyaanamide door Aspergillus niger*

| analyses na | N in mg per 120 cc vloeistof | |
|---|---|---|
| | ureum-N | ammoniak-N |
| 20 h . . . . . | 3,7 | 1,6 |
| 42 h . . . . . | 7,5 | 1,5 |
| 116 h . . . . . | 12,3 | 4,5 |
| 164 h . . . . . | 19,6 | 3,0 |

*Proef 14*

Enkele, op de hiervoren genoemde cultuurvloeistof gegroeide, dekken van *Aspergillus niger* worden in hun geheel met 20–30 cc water in een kogelmolen gedurende 24 uur gemalen. De vermalen massa wordt vervolgens in de ijskast (binnen 6 uur) afgefiltreerd Het heldere, donkerbruin gekleurde filtraat wordt daarop in de ijskast door een Chamberlandkaars gefiltreerd. Dit levert het steriele schimmelextract A.

Aan gesteriliseerde erlenmeyers wordt achtereenvolgens toegevoegd:

100 cc cyaanamidevloeistof (500 cc kalkstikstofextract [1]) verdund tot 2000 cc met water: pH 6,8),
5 cc toluol,
25 cc steriel extract A.

Aan enkele erlenmeyers wordt bovendien een bepaalde hoeveelheid ureum (16,6 mg) toegevoegd.

Aan een derde reeks kolven werd, i.p.v. extract A, een hoeveelheid van het vermalen schimmelweefsel (dat op het filter achterbleef) toegevoegd.

De aldus toebereide kolven worden weggezet bij 30 °C.

Van tijd tot tijd worden bepaald: ureum- en ammoniakgehalte.

Resultaten in tabel 25.

TABEL 25

*Ureum- en ammoniakvorming uit cyaanamide door het vermalen weefsel van Aspergillus niger en het waterige extract daarvan*

| analyse na | N in mg per 130 cc vloeistof | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | kolven + ureum | | | kolven zonder toevoeging van ureum | | | kolven + weefselbrij | | |
| | ureum-N | ammon.-N | pH | ureum-N | a mon.-N | pH | ureum-N | ammon.-N | pH |
| 0 h | 17,4 | 1,1 | 6,9 | 0,8 | 1,0 | 6,9 | 0,8 | – | 6,9 |
| 64 h | 46,2 | 1,2 | 6,9 | 34,5 | 1,0 | 6,9 | 8,7 | 15,4 | 7,5 |
| | | | | 27,3 | 1,0 | | | | |
| 88 h | 41,3 | 1,1 | 6,7 | 26,0 | 1,0 | 6,7 | 11,3 | 19,8 | 8,5 |
| | | | | 26,3 | 1,6 | 6,8 | | | |

Uit de resultaten in tabel 24 is duidelijk af te leiden, dat het extract van het hyphenweefsel van *Aspergillus niger* de eigenschap heeft cyaanamide zeer snel in ureum om te zetten. Uit de cijfers in de derde kolom blijkt, dat het vermalen weefsel deze eigenschap eveneens bezit, maar door het fijnmalen van het weefsel is de urease ook „blootgelegd". De gevormde ureum wordt tenminste voor een deel weer omgezet in ammo-

[1]) 500 cc van het extract bevatten ongeveer 600 mg cyaanamide-N.

niak. Opvallend is het, dat het extract van het schimmelweefsel geen ureasewerking vertoont. Het ureumsplitsende enzymcomplex is dus bij het vermalen en de daarop volgende filtratie niet vrijgekomen òf onwerkzaam geworden. We kunnen nu de conclusie trekken, dat het cyaanamide-hydrolyseerende complex een geheel ander karakter heeft dan het enzymcomplex urease.

Helaas zijn we niet in de gelegenheid geweest het onderzoek verder voort te zetten, evenmin als een volledig onderzoek in te stellen naar de ureumvorming uit cyaanamide door verschillende andere micro-organismen uit den op 100 °C verhitten grond.

De opzet van dit laatstgenoemde onderdeel was als volgt. In hoofdstuk III en IV behandelden we de physisch-chemische hydrolyse van cyaanamide tot ureum in den grond. We gaven op blz. 20 terloops aan, dat we alleen dàn heelemaal zeker waren van een alléén bestaande physisch-chemische hydrolyse, wanneer aangetoond werd, dat geen der, in den onvoldoend gesteriliseerden grond overgebleven micro-organismen in staat was ureum uit cyaanamide te vormen. We merkten reeds op, dat de in op 100 °C verhitten grond weer actief geworden microflora voornamelijk bestond uit kleincellige *Pseudomonas*-soorten (o.a. veel fluorescenten), welke flora verder gekenmerkt was door het vermogen tot ureum-hydrolyse. Van deze flora werden zooveel mogelijk alle soorten, die op bouillonagar (pH 7,2) tot ontwikkeling kwamen, in reincultuur geïsoleerd en gedeeltelijk onderzocht op het vermogen cyaanamide te veranderen in ureum. Hiertoe werden de stammen geënt in een cultuurvloeistof samengesteld uit 0,5 % glucose, 0,03 % cyaanamide-N + 0,01% $MgSO_4$, alles gebracht in een oplossing bestaande uit 50 cc fosfaatbuffer (pH 6,8) + 50 cc grondextract. De geïsoleerde bacteriën bleken het best te groeien in een zwak zuur milieu.

Wanneer de desbetreffende cultuur „aangeslagen" was, werd in een proefje van de cultuurvloeistof ureum- en ammoniak-N bepaald. Zonder nog in staat te zijn al deze ureum- en ammoniakcijfers der verschillende stammen te reproduceeren [1]), kunnen de in tabel 26 weergegeven resultaten met 4 veelvuldig voorkomende stammen als volkomen representatief gelden.

Afgezien van de zeer kleine hoeveelheid ureum en ammoniak, die in de cultuurvloeistoffen gevonden wordt, kan uit de weergegeven cijfers met geen mogelijkheid geconcludeerd worden tot een cumuleerende ureumvorming. Groei is er natuurlijk in deze 12 uur ook nog niet in sterke mate opgetreden. Wanneer ook, na deze 12 uur, de cultuurvloeistoffen met de verschillende stammen op aanwezigheid van ureum werden onderzocht, dan werden steeds géén, of uiterst kleine hoeveelheden gevonden.

---

[1]) Reinculturen en analyse-gegevens voor 't meerendeel verloren gegaan.

TABEL 26

*Ureum- en ammoniakvorming uit cyaanamide door enkele bacteriestammen*

| analyses na | mg N per 25 cc vloeistof | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | stam 1 | | stam 5 | | stam 8 | | stam 13 | |
| | ureum-N | ammo-niak-N | ureum-N | ammo-niak-N | ureum-N | ammo-niak-N | ureum-N | ammo-niak-N |
| 0 h | 0,37 | 0,0 | 0,37 | 0,0 | 0,37 | 0,0 | 0,37 | 0,0 |
| 6 h | 0,25 | 0,13 | 0,21 | 0,18 | 0,22 | 0,16 | 0,22 | 0,17 |
| 12 h | 0,24 | 0,16 | 0,31 | 0,16 | 0,27 | 0,21 | 0,29 | 0,17 |

*Opmerking:* Het gebruikte kalkstikstofextract bevat altijd een kleine hoeveelheid ureum.

T.a.v. de in op 100 °C verhitten grond waargenomen snelle ureumvorming kunnen we dan ook de microflora geheel uitschakelen.

Een andere kwestie is het wat er dan wèl gebeurt in deze cultuurvloeistoffen. De optredende groei gepaard gaande met een langzaam voortschrijdende N-vastlegging wijst erop, dat vele bacteriën het cyaanamide als eenige N-bron kunnen gebruiken. Dit werd overigens van verschillende zijden al aangetoond (o.a. SCHMALFUSZ). Bij den groei wordt (ondanks de varieerende hoeveelheid C) vrijwel geen ammoniak als afbraakproduct uitgescheiden, m.a.w. het cyaanamide wordt geheel voor eigen groei gebruikt. Hoe is nu de bacterie in staat de in principe giftige, beter gezegd tegennatuurlijke, cyaanamide-N om te zetten in lichaamseiwitten? Waarschijnlijk is, dat deze assimilatie via de ureumphase geschiedt, analoog aan het bij *Aspergillus niger* gevondene. Het gelijkmatige van dit proces is oorzaak dat geen ureumophooping kan waargenomen worden.

Dus, zal men zeggen, tòch ureumvorming uit cyaanamide door microorganismen. Deze bestaat inderdaad. Maar, het zal na het voorgaande zonder meer duidelijk zijn, dat deze biochemische ureumvorming in den grond niet „aan bod" zal kunnen komen. Men kan zich het proces van de afbraak in den grond aldus voorstellen. Wanneer de microflora van den grond zich aangepast heeft aan de bemesting met kalkstikstof, is ondertusschen de physisch-chemische cyaanamidehydrolyse op gang gekomen. De microflora kan zich dan, voorzoover het bacteriën (of schimmels) betreft die het enzym urease bezitten, werpen op de geleidelijk vrijkomende ureum en dit omzetten in ammoniumcarbonaat. De microorganismen in den grond bezitten een meer of minder sterke tolerantie t.o.v. cyaanamide, dus geen voorliefde om zich met de verwerking van cyaanamide bezig te houden.

Dat tenslotte de eenigszins anders geaarde *Aspergillus niger* een hoofdrol zou spelen bij de cyaanamidehydrolyse in den grond, is uit andere motieven niet erg aannemelijk. Bij onze proeven gebruikten we meestal

den zandgrond L 32. Zelfs wanneer deze grond bemest was met kalkstikstof bleek zij vrijwel geen *Aspergillus niger* te bevatten. Ook nam dit uiterst kleine aantal, na de bemesting, niet toe! Dit zou wel verwacht mogen worden indien genoemde schimmel in eerste instantie voor de opruiming van cyaanamide zou zorgen.

## § 2. *Enkele literatuurgegevens over den invloed van kalkstikstof op het bacterieleven in den grond*

In de literatuur komt de zienswijze naar voren, dat een bemesting van den grond met kalkstikstof het kiemgetal van den grond sterk beïnvloedt. ALLISON (2) toonde aan, dat een, weliswaar abnormaal groote kalkstikstofbemesting (overeenkomend met 1000–10.000 pounds zwavelzuren ammoniak per acre) aanleiding geeft tot een verveelvoudiging van het aantal op een bepaalden voedingsbodem kweekbare micro-organismen. Daar de door ALLISON gebruikte voedingsbodem de ammonificeerende bacteriën naar voren bracht, zijn het voornamelijk deze bacteriën, die de grootste vermeerdering te zien geven. De verwachting van den zoojuist genoemden onderzoeker, dat kalkstikstofbemestingen, overeenkomend met practijkomstandigheden, waarbij kleine hoeveelheden kalkstikstof over groote oppervlakten grond verdeeld worden, weinig invloed zullen hebben op de microflora, wordt tegengesproken door de onderzoekers KUHN en DRECHSEL (40), A. en G. WOLFF (88) en SCHMALFUSZ (72), die allen, werkend met in de landbouwpractijk voorkomende kalkstikstofgiften een specifieken invloed op het aantal bacteriën in den grond waarnamen. Deze invloed berust op het mengsel kalkstikstof als zoodanig, niet op één der bestanddeelen afzonderlijk (40). Over de details is men het niet heelemaal eens. ALLISON neemt de maximum vermeerdering van het aantal kiemen waar binnen twee weken na de bemesting, daarbij opmerkend, dat dit moment afhangt van een aantal factoren, zooals de hoeveelheid toegevoegde kalkstikstof, grondtemperatuur etc. A. en G. WOLFF (88) bepalen de vergrooting der kiemgetallen in verschillende grondsoorten, 24 uur, 4 en 6 weken na de bemesting met kalkstikstof. Het aantal kiemen in den grond blijkt na 24 uur een duidelijke vermindering te hebben ondergaan. Deze gaat voornamelijk ten koste van de schimmels en de sporevormers, terwijl wit- en geelgroeiende korte staafjes op den voorgrond treden. Na 4 weken is een enorme vermeerdering van het aantal kiemen waarneembaar; na 6 weken zijn de kiemgetallen nog meer toegenomen. Alles wijst er op, dat het nà de bemesting vrijkomende cyaanamide een desinfecteerende werking uitoefent, waarna de overlevende groepen zich, door het uit het cyaanamide gevormde ureum, meer of minder explosief kunnen vermeerderen. Dat deze groepen

voor het grootste gedeelte tot de ammonificeerende organismen zullen behooren is zonder meer duidelijk.

Ook SCHMALFUSZ (72) kon, echter weer uitgaande van een zeer hooge kalkstikstofbemesting (20 mg N per 100 g grond) bevestigen, dat het microleven hierdoor sterk gestimuleerd wordt. Dit werd waargenomen aan de hand van $CO_2$-productie, nitrificatie en kiemgetal, onder invloed van bemesting met ureum, ammoniumsulfaat, calciumnitraat en kalkstikstof. De $CO_2$-productie was het grootst in den grond die bemest was met kalkstikstof; de nitrificatie echter, en dit interesseert ons tenslotte het meest, kwam in den grond, bemest met kalkstikstof, het langzaamst tot stand.

De waarschijnlijk het meest met de practijk overeenkomende gegevens zijn die van MUKERJI (54). Hij deed eveneens proeven onder laboratoriumvoorwaarden over den invloed van kalkstikstof op de biologische activiteit van den grond, en vond een duidelijk stimuleerenden invloed van kalkstikstof op het kiemgetal en de $CO_2$-productie van den grond. Aangezien gewerkt werd met meststofhoeveelheden van 40 mg N per kg grond, zien we een treffende overeenkomst met onze conclusie (zie blz. 26) over de afbraak van cyaanamide in den grond onder practische omstandigheden. Het aan den grond toegevoegde cyaanamide is waarschijnlijk na $\pm$ 24–30 uur voor het grootste gedeelte in ureum omgezet. (Vergelijk hierbij de proeven van CROWTHER en RICHARDSON weergegeven op blz. 16, waarbij de omzetting, met 100 mg N per kg grond, bereikt was na 60–80 uur). De cyaanamide-schok beïnvloedt de ammonificeerende micro-organismen het minst; deze nemen, onder invloed van de gevormde ureum, snel in aantal toe. Alhoewel het bacteriënniveau dat na 2 dagen wordt bereikt niet gehandhaafd blijft (de afnemende ureumhoeveelheid wordt niet meer aangevuld) blijft het kiemgetal grooter dan wanneer de grond bemest werd met zwavelzuren ammoniak of in die zonder N-toevoeging. Het bleek MUKERJI eveneens, dat de nitrificeerende microorganismen het meest te lijden hadden onder de cyaanamidebemesting. De nitrificeerende kracht herstelt zich echter zeer snel, aangezien de giftige werking maar zeer kort blijft bestaan. Te verwachten is dus, dat na ongeveer 14 dagen het evenwicht in de microflora zich weer kan gaan instellen. De tijd van herstel van de nitrificeerende bacteriën kon, en dit is van groot belang voor de practische toepassing van kalkstikstof, aanmerkelijk bekort worden door een aëratie van den grond.

Wanneer we alle tot nu toe verzamelde gegevens in onderling verband zien, dan kunnen we het volgende concludeeren:

1. De toevoeging van kalkstikstof aan den grond veroorzaakt een tijdelijke, partieele steriliseering van den grond. Dit zou aangeduid kunnen worden met den naam „cyaanamide-schok".

Het herstel van de microflora, dat hierna intreedt, kan met verschillende snelheid tot stand komen, afhankelijk van verschillende omstandigheden, o.a. hoeveelheid meststof, grondsoort, hoeveelheid energieleverend materiaal, temperatuur, vochtgehalte, aëratie van den grond, etc. In alle gevallen is echter een zeer groote vermeerdering van het aantal kiemen in den grond waar te nemen, en deze vermeerdering betreft, voorzoover bekend, voornamelijk de ammonificeerende vormen.

2. De door de toevoeging van kalkstikstof ontstane partieele steriliseering doet het meeste kwaad aan de nitrificeerende micro-organismen als meest kwetsbare groep. Meer nog dan dat het geval was bij de ammonificeerende bacteriën, zal het herstel der nitrificeerende kracht afhangen van de onder 1 genoemde factoren, waarbij als meest regelbaren factor op den voorgrond treedt de hoeveelheid per eenheid grond gegeven kalkstikstof („Düngerkonzentration" (62)).
Hieruit blijkt duidelijk, dat het zwaartepunt bij de beoordeeling van kalkstikstof als N-meststof komt te liggen bij de nitrificatie ervan.

## HOOFDSTUK VI

# DE NITRIFICATIE VAN Ca-CYAANAMIDE

### § 1. *De afbraak van de uit cyaanamide gevormde ureum*

In het voorgaande zagen we, dat de werking van de micro-organismen bij de cyaanamide-afbraak in den grond begint bij het gevormde ureum. Ureum wordt door een groot aantal bacteriën en schimmels tot ammoniumcarbonaat omgezet, welke de bij de hydrolyse vrijkomende energie bij hun assimilatie benutten. Volgens SÖHNGEN (76) kan ureum voor de ureumhydrolyseerende bacteriën geen dienst doen als C-bron. Voor een goeden groei van deze organismen is dan ook een of andere koolhydraat of andere koolstofverbinding vereischt. De snelheid van de ureumomzetting in den grond hangt in sterke mate af van de hoeveelheid beschikbare organische stof.

Een gedeelte van het ureum wordt omgezet in ammoniak, een ander gedeelte (verreweg het kleinste) wordt door de micro-organismen in den vorm van lichaamseiwitten vastgelegd. Dit verklaart mogelijk het feit, dat bij bemesting met kalkstikstof niet altijd 100 % van de toegevoegde cyaanamide-N in den vorm van ammoniak teruggevonden wordt (zie blz. 15). De ammonificatie van cyaanamide wordt zoo goed als niet beinvloed door den bij bemesting met kalkstikstof in den grond optredenden „cyaanamide-schok", waaronder verstaan moet worden de min of meer ernstige tijdelijke vergiftiging van de microflora. Het aantal ammonificeerende micro-organismen is zeer groot, terwijl ze over 't algemeen tot de niet zeer gevoelige soorten behooren. Het ammonificatieproces is verder niet sterk afhankelijk van de temperatuur. Bij 23 °C waren, onder bepaalde omstandigheden, 10–12 mg cyaanamide-N in 100 g grond na ongeveer 110–120 uur in ammoniak omgezet; bij 0–10 °C was dit gebeurd na ongeveer 200 uur. Volgens GIBSON (19) is de ammonificatie tenslotte, binnen bepaalde grenzen, niet erg gevoelig voor den reactietoestand van den grond. Bij pH 6,1–6,5 ligt het optimum; het proces neemt met lager wordende pH geleidelijk af in intensiteit, maar is, zelfs bij pH 4,1, nog merkbaar. Naar boven neemt de ammonificatie minder snel af. Bij pH 7,6–8,0 is ze nog zeer aanzienlijk.

Het bleek ons bij een vergelijkende proef, dat een kalkstikstofbemesting van ongeveer 5,5 mg N per 100 g grond (d.i. ruim 30 kg N per ha) zich, t.o.v. de ammonificatie, gedraagt als een ureumbemesting van de-

zelfde grootte. Onder dezelfde omstandigheden waren beide meststoffen in den zandgrond L 32 bij 23 °C na 24 uur volledig geammonificeerd. De nitrificatie echter werd bij de kalkstikstofbemesting 48–72 uur vertraagd. Duidelijk blijkt dus, dat de moeilijkheden bij deze bemesting liggen bij de nitrificatie ervan en bij klimatologische- en cultuuromstandigheden.

### § 2. *Nitrificatie van cyaanamide*

Om nader ingelicht te worden over de nitrificatie van het uit het cyaanamide ontstaande ammoniak, werden de nitrificatie van zwavelzuren ammoniak en Ca-cyaanamide onderling vergeleken in den zandgrond L 32.

*Proeven 15 t/m 17*

15. Telkens 100 g grond werden bemest met 10 mg N in den vorm van zwavelzuren ammoniak. Van tijd tot tijd werden van den grond ammoniak- en nitraatgehalte bepaald.
16. 100 g grond bemest met 10 cc kalkstikstofextract (pH 7), bevattend 14 mg totaal-N. Analyses als voren op ammoniak en nitraat.
17. Idem als voren. Het hier gebruikte kalkstikstofextract had een pH van 12,2. Het bevatte 15,6 mg totaal-N en 14,2 mg cyaanamide-N. Analyses als vorige proeven.

Omzettingstemperatuur bij alle proeven 23 °C.

Resultaten proeven 15 t/m 17 in tabel 27 (fig. 14 en 15).

TABEL 27

*Nitrificatie van kalkstikstofextract vergeleken met die van zwavelzuren ammoniak in zandgrond L 32*

| analyses na | zwavelzure ammoniak | | kalkstikstofextract pH 7 | | kalkstikstofextract pH 12,2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ammoniak-N | nitraat-N | ammoniak-N | nitraat-N | ammoniak-N | nitraat-N |
| 0 dagen . . . . | 10,0 | 0,4 | – | 0,4 | – | 0,4 |
| 2½ „ . . . . | 8,3 | 0,8 | – | 0,4 | 8,5 | 0,4 |
| 8 „ . . . . | 6,7 | 2,2 | – | – | – | – |
| 10 „ . . . . | – | – | 12,2 | 1,1 | 12,5 | 1,0 |
| 14 „ . . . . | 5,5 | 4,2 | – | – | – | – |
| 16 „ . . . . | – | – | 11,8 | 1,9 | 11,8 | 1,8 |
| 26 „ . . . . | 3,0 | 7,5 | 10,0 | 4,5 | 10,5 | 4,1 |
| 37 „ . . . . | 1,0 | 10,8 | 8,3 | 7,3 | 9,8 | 6,4 |

Fig. 14, waarin de nitrificatie van zwavelzuren ammoniak is weergegeven, spreekt voor zichzelf. Men ziet een geleidelijke vermeerdering van het nitraatgehalte, samengaande met een geleidelijke vermindering van de hoeveelheid ammoniak-N. Hieruit valt te concludeeren, dat na toe-

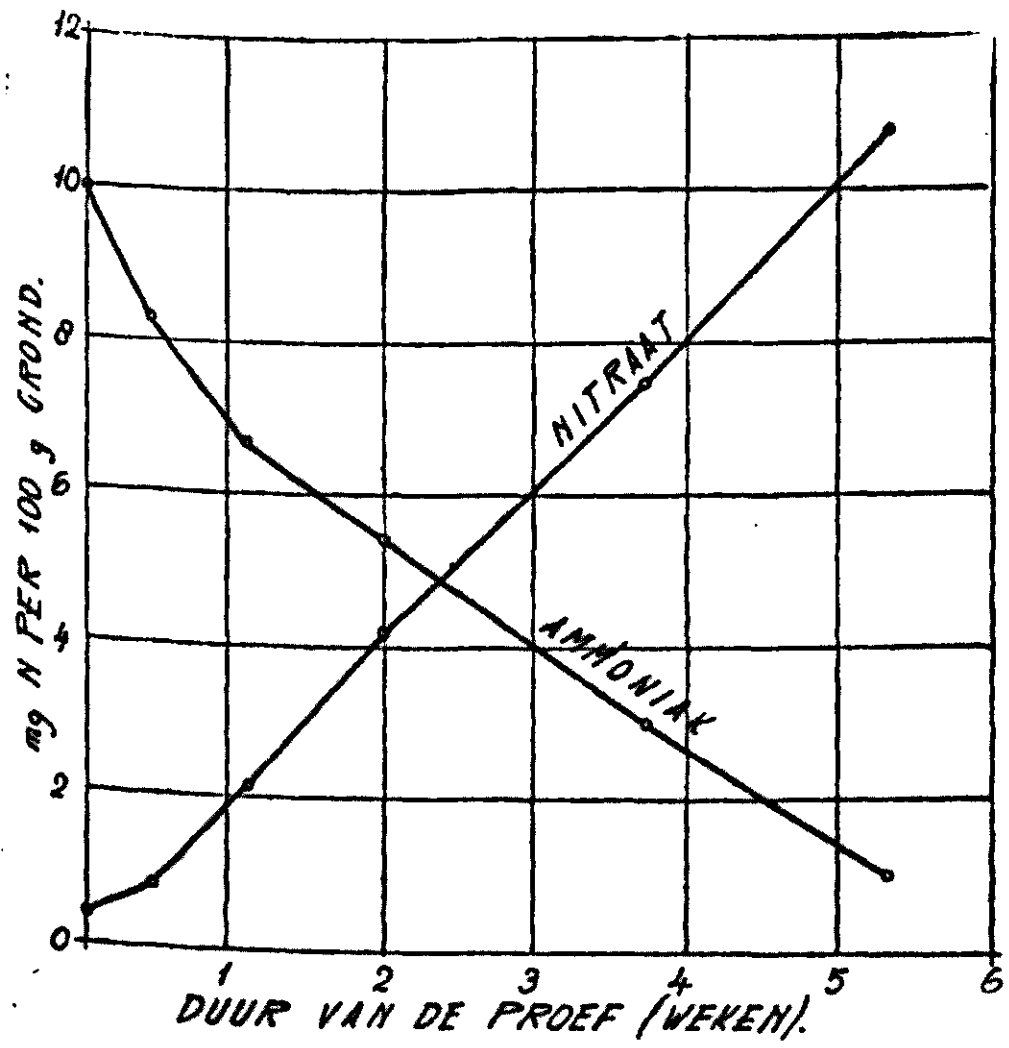



Fig. 14. Nitrificatie van zwavelzuren ammoniak in zandgrond L 32

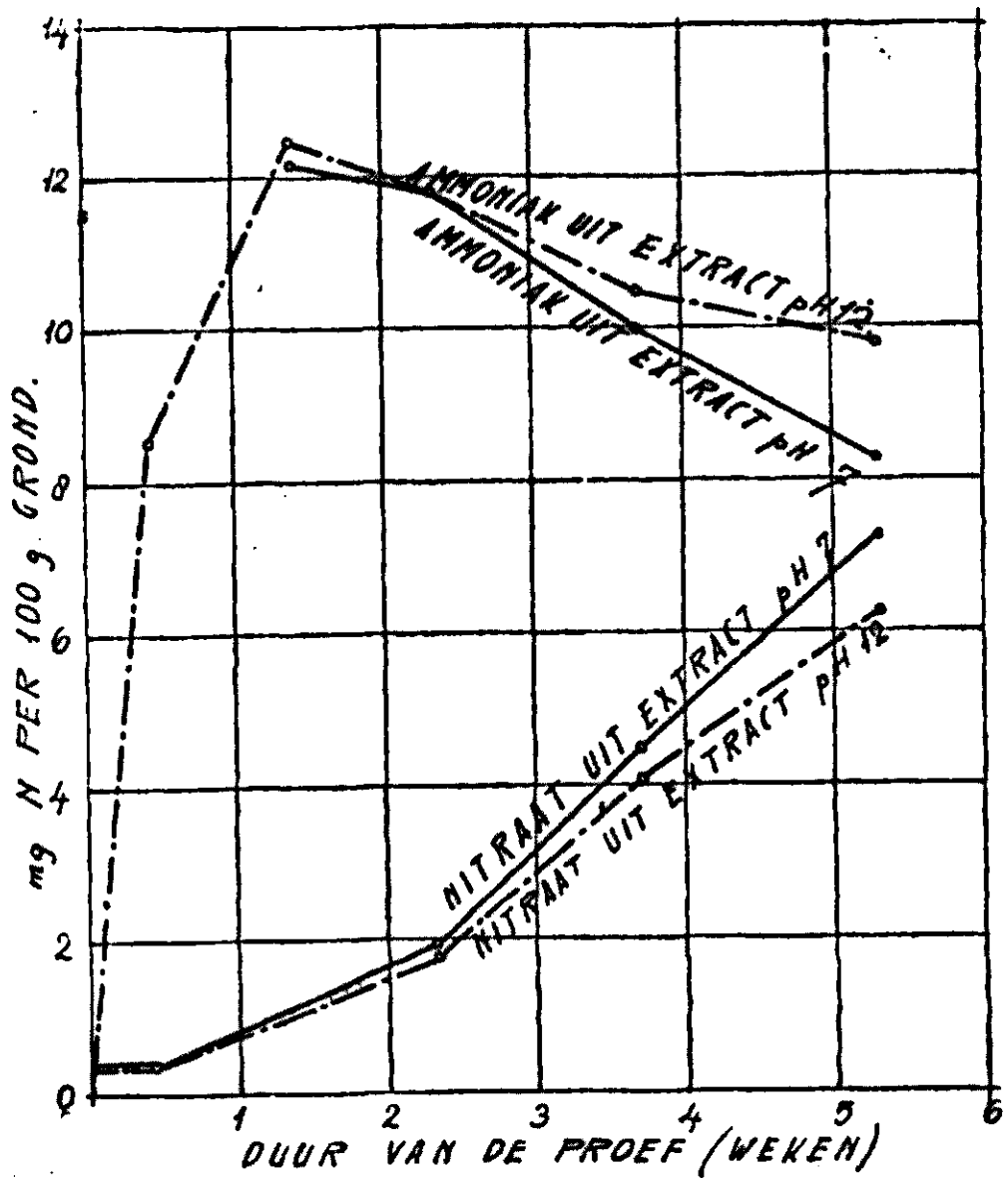



Fig. 15. Nitrificatie van kalkstikstof-extract in zandgrond L 32

voeging van ammoniumsulfaat de nitrificatie vrijwel onmiddellijk inzet. Deze zal in het beschouwde geval na ongeveer 6 weken beëindigd zijn.

Uit fig. 15 kunnen we lezen, dat de nitrificatie van den uit het kalkstikstofextract gevormden ammoniak eenigszins anders verloopt. Het „op gang komen" van de nitrificatie duurt langer. Dit is het gevolg van den reeds eerder aangeduiden „cyaanamide-schok". Of de remming ook nog veroorzaakt wordt door de aanwezigheid van b.v. dicyaandiamide is zonder meer niet uit te maken. Na ongeveer 16 dagen gaat het verloop van de nitraatlijnen in het cyaanamide-geval veel op die van fig. 14 lijken. Wanneer we ons even beperken tot de proef met zwavelzuren ammoniak en die met kalkstikstofextract pH 7, dan volgt uit het voorgaande, dat de nitrificatie van een geneutraliseerd extract eenige dagen later begint dan die van zwavelzuren ammoniak in denzelfden grond. Om nader te verduidelijken, dat ook dàn de nitrificatie van het extract nog niet even snel verloopt als die van zwavelzuren ammoniak, zijn de ammoniak- en nitraatcijfers van proeven 15 en 16 nog eens in één grafiek uitgezet. (fig. 16).

Het verschil in nitrificatie tusschen zwavelzuren ammoniak en kalkstikstofextract komt niet alleen tot uiting in het minder steile verloop van de nitraatlijn, maar ook in het veel vlakkere verloop van de ammoniaklijn. Het achterblijven van de nitrificatielijn bij bemesting met kalkstikstofextract is mogelijk niet alleen te verklaren door de nawerking van

den cyaanamide-schok. Na 2–3 dagen was zeker alle cyaanamide in ureum omgezet, zoodat de nitrificeerende bacteriën zich, in elk geval, na 10 dagen hersteld konden hebben. Er zou dan nog een andere invloed werkzaam zijn, die de nitrificeerende kracht eenigszins verlamt. Onmiddellijk denken we dan weer aan het dicyaandiamide. Deze verbinding was zeker in kleine hoeveelheid in het gebruikte extract aanwezig. Ook het vlakke verloop van de ammoniaklijn wijst in die richting, al wordt die er niet geheel door verklaard. Met het extract werden 14,5 mg N aan den grond toegevoegd.

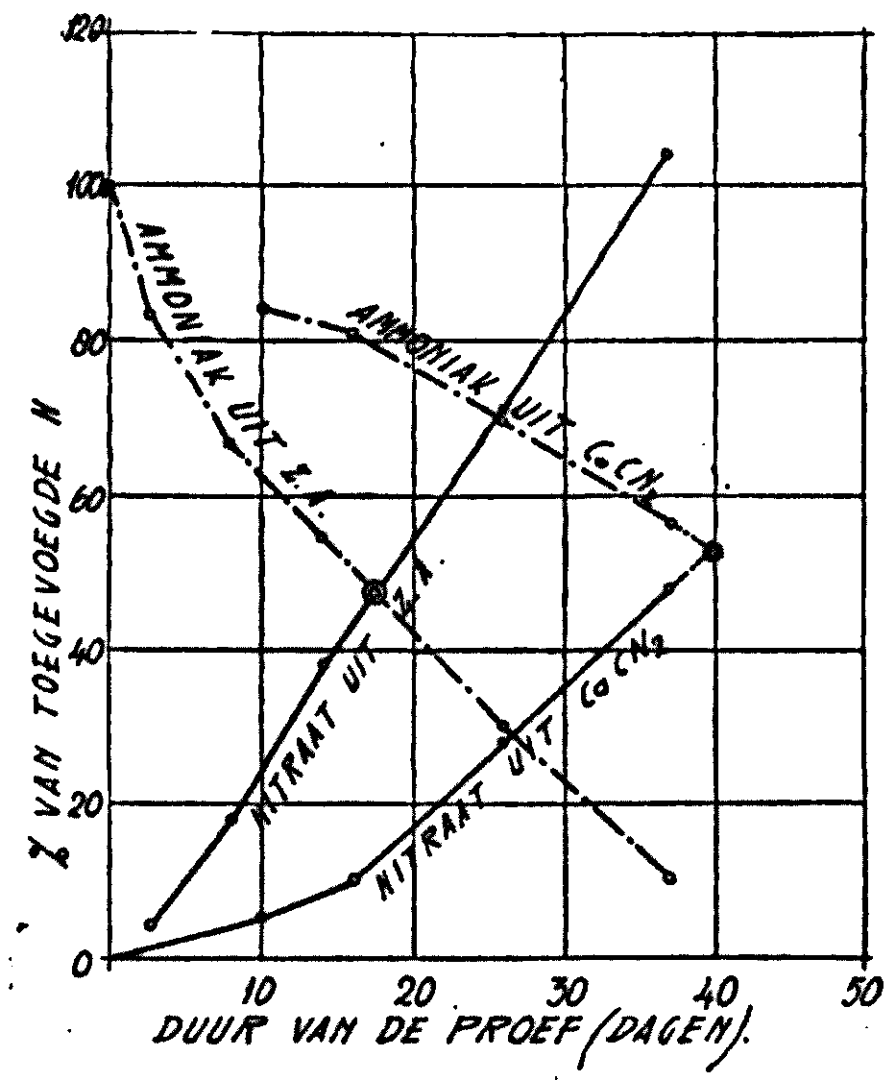



Fig. 16. Vergelijking van de nitrificatie van zwavelzuren ammoniak met dien van kalkstikstofextract pH 7, in zandgrond L 32

De geneutraliseerde kalkstikstofextracten bevatten meestal een kleine hoeveelheid ureum en dicyaandiamide. Wanneer we, na ongeveer 10 dagen (zie tabel 27) in den grond bemest met het extract (totaal-N = 14,5 mg) slechts 12,2 mg ammoniak-N vinden, dan valt hieruit af te leiden, dat er in den loop van de proef nog méér vrij zal komen. Nu gaan hier enkele verschijnselen door elkaar spelen. De partieele steriliseering door Ca-cyaanamide leidde tot een sterke vermeerdering van het aantal ammonificeerende micro-organismen. Deze vermeerdering zal een vergroote N-vastlegging met zich mee brengen, waardoor dus op een gegeven oogenblik niet alle toegevoegde N als ammoniak-N teruggevonden zal worden. Dat tenslotte evenwel alle N, en mogelijk nog méér (door de verhoogde activiteit der ammonificeerende bacteriën), in de circulatie terug zal komen blijkt uit de ligging van het snijpunt van ammoniak- en nitraatlijn („Nitrifikationshalbzeit"). De ligging van dit punt geeft eveneens aan, dat er van de hoeveelheid ammoniak niet alleen t.g.v. nitrificatie voortdurend afgaat, doch ook bij komt na het moment, waarop aangenomen mag worden, dat alle cyaanamide in ammoniak is omgezet. Genoemd punt ligt bij 48 % ammoniak- en 48 % nitraat-N (totaal 96 %) in het geval de grond bemest werd met zwavelzuren ammoniak. Stellen we het totaal-N-gehalte van het gebruikte extract = 100, dan komt het snijpunt van de ammoniak- en nitraatlijn bij de proef met kalkstikstofextract pH 7 volgens fig. 16 waarschijnlijk te liggen bij 53 % ammoniak- en 53 % nitraat-N, hetgeen op een N-winst wijst. Deze winst is, zooals

hiernaast werd aangegeven, afkomstig van de, door sterk verhoogde micro-organismenactiviteit, uit de organische N-verbindingen uit den grond afgesplitsten ammoniak. Niet alleen wordt in het besproken geval bij bemesting met kalkstikstof alle met de meststof aan den grond toegevoegde N tenslotte genitrificeerd, ook wordt nog een hoeveelheid N, afkomstig uit de N-reserve van den grond, in het nitrificatieproces opgenomen.

Het met den zandgrond L 32 gevondene kan evenwel niet zonder meer op elk willekeurig practijkgeval overgebracht worden. Veel hangt af van de bedoelde N-reserve en van de C/N-verhouding in den grond.

We kunnen dus naar aanleiding van de proeven 15 t/m 17 t.a.v. de nitrificatie van kalkstikstofextract in den grond concludeeren, dat deze bij ongeveer gelijke hoeveelheden toegevoegde N, eenige weken later beeindigd zal zijn dan die van zwavelzuren ammoniak.

Afhankelijk van den toestand waarin de grond verkeert en de gebruikte mestconcentratie, zal deze periode van langeren of korteren duur zijn. In ons geval was ze 2–3 weken. De met kalkstikstofextract-bemesting gepaard gaanden cyaanamide-schok veroorzaakt een uitblijven van het begin van de nitrificatie van 8 dagen.

### § 3. *Enkele factoren, die de nitrificatie van kalkstikstof beïnvloeden*

De tot hiertoe verkregen gegevens betreffen een bepaald geval, waarbij het Ca-cyaanamide in oplossing aan den grond werd toegevoegd. Hoe gaat een en ander nu, wanneer met de vaste stof kalkstikstof bemest wordt?

De oplossing van cyaanamide zal dan in den grond, door het vrijkomen van het Ca-cyaanamide in de waterige phase, geleidelijk ontstaan.

De literatuurgegevens over de schadelijke werking van kalkstikstof op de nitrificatie loopen nogal uiteen. JACOB, ALLISON en BRAHAM (28) bemestten een „Susquehanna-loam, well supplied with organic matter and quite productive", met kalkstikstofhoeveelheid van 20,9 mg N per 100 g grond. In dezen grond blijft de nitrificatie 70 (!) dagen uit t.o.v. die van zwavelzuren ammoniak en ureum. Dit kan ons niet verwonderen daar deze gift overeenkomt met ongeveer 120 kg N per ha. Bovendien hadden genoemde onderzoekers nog, per 100 g grond, 1 g $CaCO_3$ toegevoegd ter neutraliseering van de bij de nitrificatie te verwachten hoeveelheid zuur. Hierdoor werd de pH in den grond te hoog, waardoor er meer kans was op dicyaandiamide-vorming.

Van meer belang zijn de gegevens van GIESECKE en STERZ (21). Deze onderzoekers gingen de nitrificatie van kalkstikstof na in 7 verschillende gronden, waarvan hier enkele genoemd worden. De meststof werd gegeven in een hoeveelheid van 20 mg per 100 g grond. (Dus ook weer een ons inziens te groote gift.)

TABEL 28

*Enkele karakteristieken van de in het onderzoek van Giesecke en Sterz gebruikte gronden*

| grond | pH ($H_2O$) | pH (KCl) | uitw. zuurheidsgraad | % C | ads. cap. (KNOP) | kleifractie | V | T |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 3,7 | 3,2 | 47,0 | 7,7 | 99,0 | 26,5 | 6,7 | 28,8 |
| B | 4,1 | 3,2 | 8,05 | 5,1 | 33,4 | 2,3 | 8,2 | 12,7 |
| C | 5,8 | 5,3 | 0,26 | 5,9 | 143,5 | 48,0 | 82,8 | 33,8 |
| E | 7,8 | 7,1 | 0,10 | 0,2 | 17,8 | 3,6 | 100,0 | 1,3 |
| F | 8,2 | 7,4 | 0,10 | 2,1 | 80,8 | 31,0 | 100,0 | 11,9 |

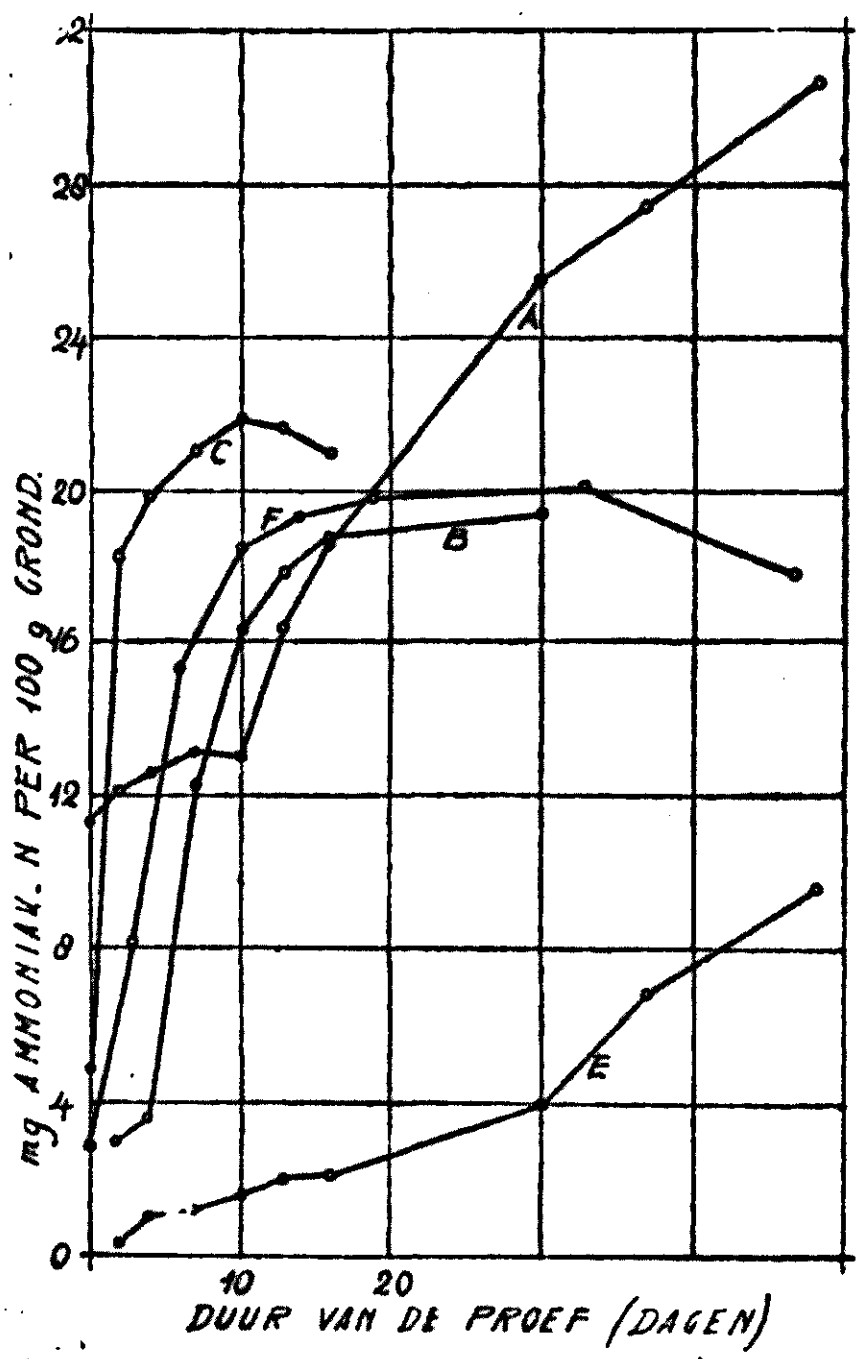



Fig. 17. Ammoniakvorming uit kalkstikstof in verschillende gronden (naar Giesecke en Sterz)

In fig. 17 zijn weergegeven de ammoniakcijfers van de ammonificatie van de kalkstikstof; in fig. 18 de overeenkomstige nitraatcijfers. De nitraatcijfers zijn gegeven ondanks het feit, dat de gevolgde methodiek eenige waakzaamheid noodig maakt.

De hier besproken gronden vallen, wat hun ammoniakvorming uit kalkstikstof betreft, in drie groepen uiteen, nl.:

1. gronden C, F en B,
2. grond A,
3. grond E.

Gronden C, B en F laten een meer of minder snelle omzetting zien van cyaanamide in ammoniak. Vergelijken we bij deze gronden onderling de gegevens in tabel 28, dan zijn de, overigens kleine, verschillen wel te verklaren aan de hand van onze beschouwingen in hoofdstukken III en IV. De volgorde in omzettingssnelheid is C > F > B. Tusschen C en F is weinig verschil. C heeft een vrij lage pH, gepaard gaande aan een hoog humusgehalte en veel kleibestanddeelen; F daarentegen heeft een hooge pH tezamen met minder humus en klei. Het onderlinge verschil is echter minder duidelijk, omdat de hoeveelheid katalyseerend materiaal in beide gevallen zeer hoog is. B bezit een lage pH, met daarnaast echter een vrij hoog humusgehalte en een kleine hoeveelheid kleibestanddeelen. Een en ander zal een omzettingssnelheid veroorzaken, die niet veel verschilt

van grond F. Grond A demonstreert nog eens duidelijk, dat de omzetting cyaanamide → ammoniak uit twee afzonderlijke phasen bestaat. Physisch-chemisch gesproken is A voorbestemd om een snelle omzetting van cyaanamide in ureum te zien te geven; een lage pH gepaard aan hooge gehalten klei en humus. Maar de vlotte afloop van de reactie tot ammoniak wordt geremd door de... te lage pH, die zelfs op de ammonificeerende bacteriën remmend moet werken (zie GIBSON); toch herstelt de microflora zich door aanpassing aan het milieu (ook het Ca-gehalte van de kalkstikstof werkt hieraan mee). Na 10 dagen begint inderdaad de ammoniakvorming door te zetten. Zooals te verwachten was, past grond A zich van dit oogenblik af goed bij de zoojuist behandelde grondsoorten aan. E heeft een zeer laag klei- en humusgehalte; bovendien is de grond, biologisch gesproken, zeer inactief. Hierdoor zal het cyaanamide zeer langzaam en onvolledig in ammoniak worden omgezet.

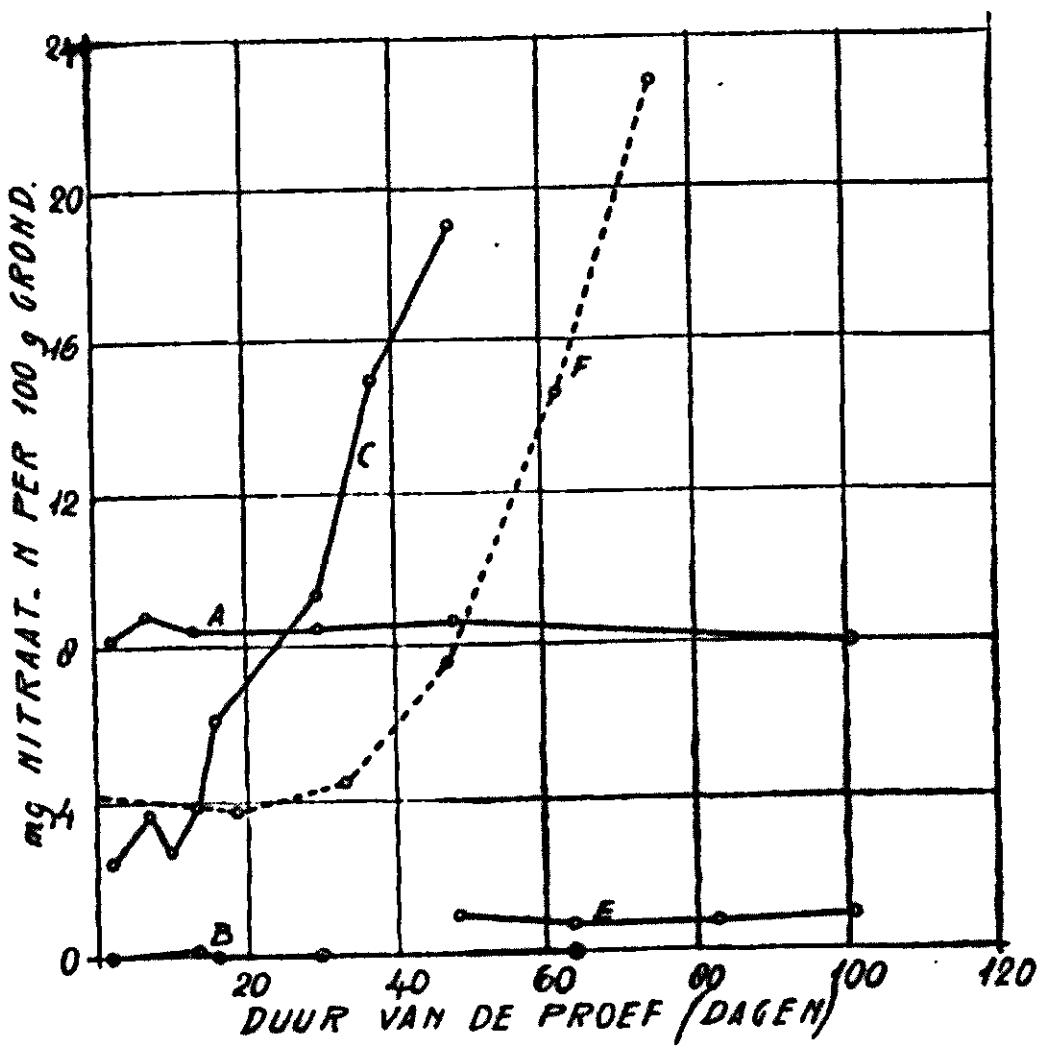



Fig. 18. Nitrificatie van kalkstikstof in verschillende gronden (naar GIESECKE en STERZ)

Een geheel ander beeld geeft de nitrificatie in deze gronden te zien. Hier hebben we niet veel meer aan de physische en chemische grootheden van de gronden alléén. De groepenverdeeling t.a.v. de nitrificatie is als volgt:

1. C en F als goed nitrificeerende gronden,
2. A, B en E als gronden, die kalkstikstof vrijwel niet nitrificeerden.

C en F blijken dus niet alleen physisch-chemisch gesproken goede gronden te zijn, ook bij de nitrificatie kunnen ze meedoen. De pH voldoet aan de eischen daaraan gesteld door de nitrificeerende bacteriën; het hooge gehalte aan kleimineralen verhindert een giftige werking van den vrijgekomen ammoniak op *Nitrobacter*. GIESECKE en STERZ verklaren het uitblijven van nitrificatie in grond B als volgt: „bei Boden Königsmoor (door ons B genoemd) läszt sich die geringe Nitrifikation wohl auch zum Teil auf seine stark saure Reaktion (zooals bij A) zum Teil aber auch (zooals bij E) darauf zurückführen, dasz dieser adsorptionsschwache Boden

nicht imstande war das gebildete freie $NH_3$ festzulegen, wodurch eine Schädigung von Nitrobakter eintrat". Deze laatste bewering wordt echter niet met dienovereenkomstige $NO_2$-bepalingen gestaafd. Beter kunnen we het uitblijven van nitrificatie in gronden A, B en E als volgt verklaren. In grond E kon na 48 uur nog cyaanamide aangetoond worden. Zien we af van de vorming van dicyaandiamide onder deze voorwaarden (die echter heel goed mogelijk is), dan zal de in beperkte mate aanwezige nitrificeerende microflora zoodanig vergiftigd worden door het cyaanamide, dat herstel uitgesloten is.

In grond B is de pH te laag voor de nitrificeerende bacteriën. Bovendien stonden deze organismen gedurende 7 dagen bloot aan den giftigen invloed van cyaanamide. Dat de nitrificatie onder andere omstandigheden ook niet goed genoemd kan worden in dezen grond blijkt uit het hooge gehalte aan ammoniak (11,3 mg N per 100 g grond). Tenslotte kan het uitblijven van nitrificatie in grond A niet anders dan verwacht worden (pH 3,7; uitwisselingszuurheidsgraad 47 cc).

Uit het voorgaande bleek duidelijk de invloed van bepaalde eigenschappen van den grond op de nitrificatie van kalkstikstof. Uit het volgende zal blijken, dat ook het vochtgehalte en de temperatuur van den grond en de gebruikte hoeveelheid kalkstikstof per gewichtseenheid grond van het grootste belang zijn voor het bereikte resultaat.

*Vochtgehalte van den grond*

Het gebruik van kalkstikstof als meststof heeft onder practijkvoorwaarden tot zeer uiteenloopende resultaten geleid. Dit is niet zoo te verwonderen daar het succes van de kalkstikstof-bemesting sterk afhankelijk is van uitwendige omstandigheden, o.a. klimaatfactoren. Het viel b.v. op, dat een natte periode in den voorzomer de nitrificatie van cyaanamide ongunstig beïnvloedde, waardoor de bemesting slecht aan haar doel beantwoordde (28). Met dergelijke mededeelingen moet men uitermate voorzichtig zijn. De invloed van een bepaalden factor kan eerst dan verantwoordelijk gesteld worden voor een waargenomen verschijnsel, wanneer alle verdere factoren volledig bekend zijn en constant gehouden worden. De ongunstige invloed van de natte periode is alleen verklaarbaar wanneer ze samenvalt met de kalkstikstofbemesting. Hierdoor is het gevaar groot, dat het cyaanamide uitgespoeld wordt.

Verder komt men de opmerking tegen, dat kalkstikstof uitgestrooid moet worden bij lage temperatuur, aangezien bij hooge temperatuur gevaar bestaat voor dicyaandiamidevorming, waardoor de nitrificatie benadeeld wordt. Deze raad is waarschijnlijk eveneens foutief, omdat de schadelijkheid van kalkstikstof meer door droogte dan door hooge temperaturen bevorderd wordt.

JACOB, ALLISON en BRAHAM gingen de nitrificatie na van kalkstikstof

vergeleken met die van ureum, in grond met verschillend vochtgehalte. Het vochtgehalte van den grond was t/m 30 % $H_2O$ niet van veel invloed op de nitrificatie. Een gehalte van 30 g water per 100 g grond (hier overeenkomend met ongeveer 75 % van de watercapaciteit) lijkt het gunstigst. Zeker was dat het geval bij de nitrificatie van uit ureum afkomstige ammoniak. Dit is in tegenspraak met de algemeen als optimaal aanvaarde verzadiging van 50 % van de watercapaciteit (dit is 21 % water in deze proef). In elk geval is uit deze proefserie te concludeeren, dat, aangezien nitrificatie in het algemeen het beste verloopt in grond met een watergehalte van 60–75 % van de watercapaciteit, dit ook het geval zal zijn bij de kalkstikstofbemesting.

*Temperatuur van den grond*

JACOB, ALLISON en BRAHAM deelen eveneens bijzonderheden mede over de nitrificatie van kalkstikstof bij verschillende temperaturen. Deze onderzoekers vinden de beste nitrificatie bij 30–38,5 °C. Ook WIENHUES (87) vond iets dergelijks. Bij + 2 °C had in twee grondsoorten (een lichte, arme, zure grond en een zwaardere, vruchtbare grond) géén nitrificatie plaats. Terwijl de arme, zure grond ook bij verhoogde temperatuur (tot 30 °C) geen nitrificatie te zien geeft, neemt de nitraatvorming in den beteren grond voortdurend in intensiteit toe met hoogere temperatuur. Het optimum in de nitraatvorming ligt bij 30 °C.

De zoojuist behandelde proeven van JACOB, ALLISON en WIENHUES geven, in verband met de bij aanwezigheid van kalkstikstof niet geheel betrouwbare nitraatbepaling, slechts een globaal beeld van den invloed van de temperatuur en de vochtigheid van den grond op de nitrificatie van kalkstikstof. Uit deze gegevens blijkt evenwel duidelijk, dat de nitrificatie sterk afhankelijk is van de grondsoort, doch ontegenzeggelijk met verhoogde temperatuur in intensiteit toeneemt. Naast een watergehalte van den grond naar 60–75 % van de watercapaciteit zal voor de nitrificatie van kalkstikstof dus een zomertemperatuur boven 20 °C het gunstigste zijn. Bij temperaturen $<$ 10 °C zal kalkstikstof vrijwel niet genitrificeerd worden.

*Hoeveelheid kalkstikstof per gewichtseenheid grond („Düngerkonzentration"* (62))

JACOB c.s. (28) onderzochten de nitrificatie bij verschillende hoeveelheden kalkstikstof. Daar de voor nitrificatie optimale kalkstikstofconcentratie in den grond, méér dan dat bij een andere N-meststof het geval is, sterk zal varieeren met de gebruikte grondsoort hebben de desbetreffende onderzoekingen van RATHSACK (62) ons meer te vertellen dan die van JACOB c.s.

RATHSACK onderzocht de nitrificatie van kalkstikstof in vier verschillende typen grond, nl.:

1. een zeer zure lichte zandgrond . . . . . pH 4,0
2. een zure zandgrond . . . . . pH 5,5
3. een leemhoudende zandgrond . . . . . pH 7,0
4. een kalkhoudende, humusrijke zandgrond . . . . . pH 7,8

De nitrificatie in deze gronden bleek sterk af te hangen van de gebruikte hoeveelheid kalkstikstof per eenheid grond. De genoemde gronden nitrificeerden de kalkstikstof, gegeven naar 8–16 mg N per 100 g grond (overeenkomend met 250–350 kg kalkstikstof per ha) geheel, met uitzondering van den eerstgenoemden zuren grond, die een zeer onvolkomen nitrificatie te zien gaf. T.g.v. reactieverschuivingen, door de gelijktijdig met het cyaanamide toegevoegde kalk, werd evenwel kalkstikstof beter genitrificeerd dan ammoniumsulfaat. De normaal bij kalkstikstof bemesting optredende vertraging van de nitrificatie werd grooter met toenemende hoeveelheden van de meststof.

§ 4. *De invloed van dicyaandiamide op de nitrificatie en de plant*

Uit het in de voorgaande hoofdstukken meegedeelde blijkt duidelijk, dat men bij bemesting met gangbare hoeveelheden kalkstikstof (tot 100 kg N per ha) op gronden met een hoog percentage actief materiaal, die in goeden cultuurtoestand verkeeren, onder gemiddeld normale klimatologische omstandigheden niet bang behoeft te zijn voor dicyaandiamidevorming. De angst voor dicyaandiamide als storende factor voor de nitrificatie verschafte ons in de literatuur verschillende onderzoekingen naar den invloed van deze stof op de nitrificatie, waarvan enkele van recenteren datum gememoreerd zullen worden.

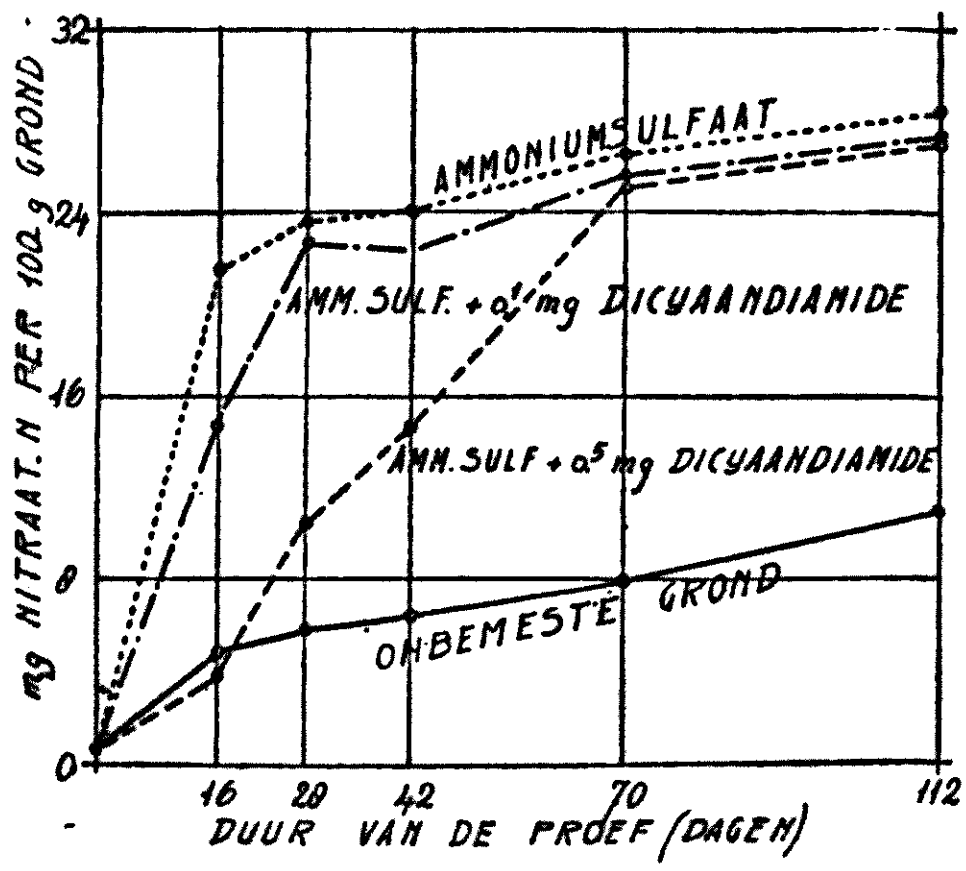



Fig. 19. De invloed van dicyaandiamide op de nitrificatie van zwavelzuren ammoniak (I) (naar JACOB, c.s.)

COWIE (11) stelde een duidelijke verlamming van de nitrificatie door dicyaandiamide vast. Met een toevoeging van slechts 30 mg N per 100 g grond kon genoemde onderzoeker de nitrificatie gedurende verscheidene maanden geheel onderdrukken, terwijl een toevoeging van 15 mg dicyaandiamide-N per 100 g grond de nitrificatie gedurende ± 42 dagen verhinderde. Deze giftige invloed blijft beperkt tot

de nitrificeerende bacteriën, daar de andere micro-organismen, met name de ammonificeerende, hun werking normaal blijven uitoefenen.

JACOB c.s. (28) konden eveneens aantoonen, dat dicyaandiamide zeer giftig werkt op de nitrificeerende kracht van den grond. De voor nitrificeerende bacteriën giftige werking wordt echter op den duur opgeheven. Dit moment is sterk afhankelijk van de aan den grond toegevoegde hoeveelheden. Uit fig. 19 en 20, ontleend aan (28) blijkt dit nog eens duidelijk. Zelfs een kleine hoeveelheid van 0,1 mg dicyaandiamide per 100 g grond vertraagde de nitrificatie van ammoniumsulfaat. Met vergroote dicyaandiamidegiften werd dit vertragende effect duidelijker, totdat bij een hoeveelheid van 10,5 mg dicyaandiamide per 100 g grond absoluut geen nitrificatie tot stand kwam gedurende 7 maanden.

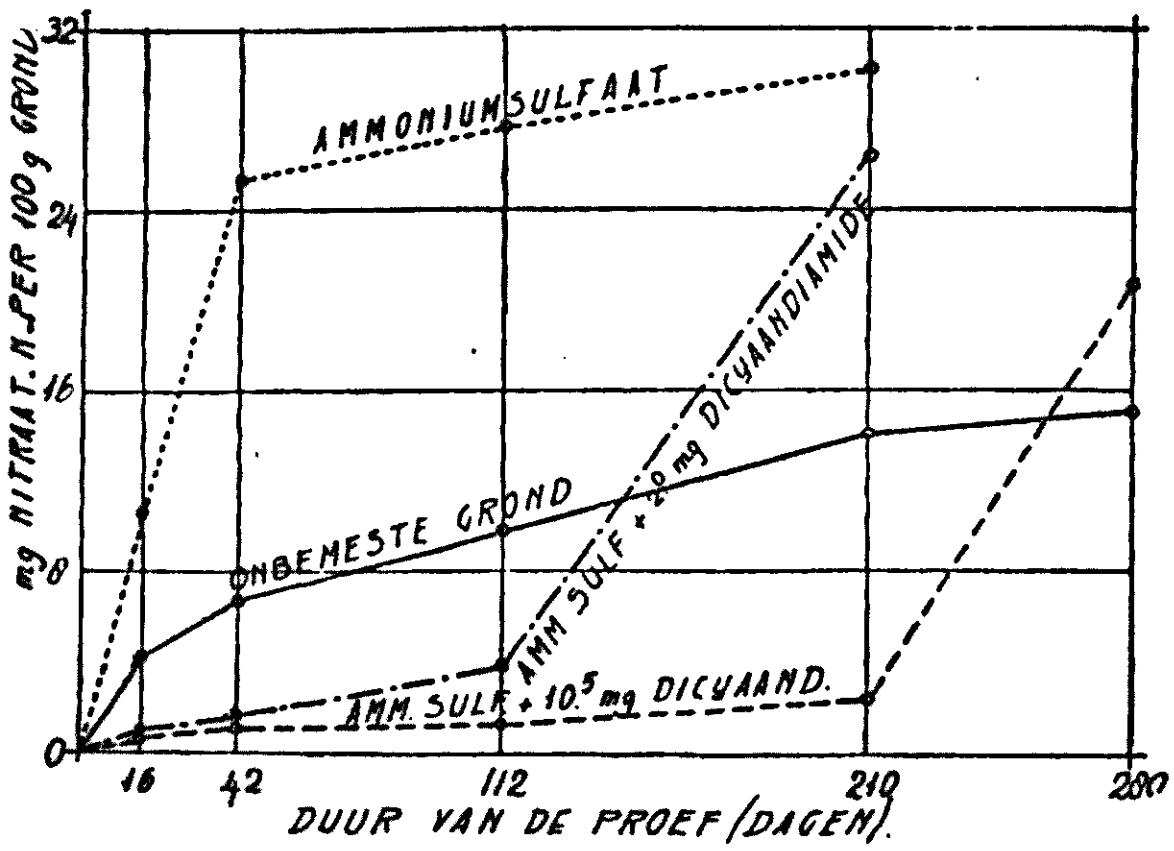



Fig. 20. De invloed van dicyaandiamide op de nitrificatie van zwavelzuren ammoniak (II) (naar JACOB, c.s.)

Deze remmende eigenschap van het dicyaandiamide doet ons een middel aan de hand, om in elke willekeurige grondsoort de uit kalkstikstof gevormde ammoniak te bepalen en de tijd aan te geven, waarbinnen deze ammonificatie tot stand komt.

In ons eigen onderzoek kon deze giftige werking van dicyaandiamide op de nitrificatie nog eens bevestigd worden.

Tot nu toe is hier steeds sprake geweest van de giftige werking van het dicyaandiamide als zoodanig. Het is echter heel goed mogelijk dat, daar dicyaandiamide door de micro-organismen in den grond wordt afgebroken, afbraakproducten van dicyaandiamide deze toxische werking bezitten. Deze mogelijkheid werd wel onderzocht bij hoogere planten. Waren deze gegroeid op grond waaraan dicyaandiamide werd toegevoegd, dan vertoonden zij een min of meer duidelijke verdorring van de bladpunten en bladranden aan het uiteinde der bladeren (zie plaat). Dit verschijnsel werd o.a. door LOEW (47) al uitvoerig beschreven onder den naam „Spitzenvertrocknung". De vraag of de neutrale, chemisch indifferente verbinding dicyaandiamide als zoodanig giftig is voor landbouwgewassen

werd in 1908 al ontkennend beantwoord. Het bleek IMMENDORF (27) en WAGNER (85) echter, dat veldvruchten bij potproeven beschadigd werden bij gebruik van dicyaandiamide als meststof. De planten werden wel rijp, doch de oogsten bleven zelfs ten achter bij die van de potten, die niet met N waren bemest. Men vroeg zich af of deze schade aan het gewas het gevolg was van:

1. vergiftiging van het levende organisme door het onveranderde dicyaandiamide, òf
2. vergiftiging door bepaalde verbindingen, die in den grond door de micro-organismen uit het dicyaandiamide zijn ontstaan.

Volgens MAZÉ en LEMOIGNE (51) is het eerstgenoemde niet het geval. In steriele watercultures (waarbij bacteriologische afbraak van het cyaanamide niet mogelijk was) werd waargenomen, dat dicyaandiamide niet giftig werkte op het blad en/of andere deelen van de maisplant. Volgens ASO (4) is dicyaandiamide in watercultures in een concentratie van 0,01 % zelfs een N-bron voor de plant. O. LOEW (47) had al eerder getracht op de hierboven gestelde vraag een antwoord te geven door gerst te laten groeien in potten met ongesteriliseerden en met gesteriliseerden grond. De sterilisatie had plaats gehad door den grond in vochtigen toestand gedurende 1 uur op 100 °C te verhitten. Ter vergelijking werd een andere serie potten bemest met zwavelzuren ammoniak. Juiste conclusies konden uit de resultaten van deze proevenserie niet verkregen worden, want het is duidelijk, dat een grond, die gedurende 1 uur op 100 °C verhit is geweest, allesbehalve steriel is.

Welke de door de micro-organismen in den grond uit dicyaandiamide gevormde verbindingen zijn, en welke daarvan voor de giftige werking op plant en bacterie aansprakelijk gesteld kunnen worden is nog niet bekend. Wel worden in de literatuur gissingen hieromtrent naar voren gebracht. Hoe dit ook zij: voor ons is het voldoende te weten, dat het toevoegen aan of het ontstaan in den grond van dicyaandiamide zeer ongewenscht is, zoowel door de directe schade aangericht aan het cultuurgewas als door de indirecte schade, die de plant lijdt door den giftigen invloed op de nitrificeerende bacteriën in den grond. PRANKE (60) merkt evenwel op, dat de plant geen schade ondervindt, zoolang er niet meer dicyaandiamide aanwezig is dan 10 % van de d.m.v. kalkstikstof aan den grond toegevoegde stikstof. Volledigheidshalve zij hier opgemerkt, dat dicyaandiamide in tegenstelling met cyaanamide de kieming van zaden niet benadeelt. De schade aan de ontkiemende plant wordt door COWIE als volgt beschreven: „...Its (van dicyaandiamide) toxicity was first revealed a few days after the germination by the white tips or margins of the cotyledons. The other leaves became similarly affected in turn. With small amounts the injury was confined to the extreme tips

Plaat I: Rogge gegroeid in met dicyaandiamide bemesten grond.

of the leaves and the plants showed more or less normal growth. The larger dressings however caused a progressive withering of the leaves from the tips downwards and subsequently depressed the growth below that of the controls, or finally, in sufficient quantity, killed the plant."

Door dicyaandiamidevorming uit cyaanamide gaat een gedeelte van de N uit kalkstikstof voor de plant verloren, waardoor de waarde ervan natuurlijk ook nog vermindert. Nu blijkt echter uit het in de vorige hoofdstukken naar voren gebrachte duidelijk, dat we onder normale voorwaarden, uitgaande van een kalkstikstof-preparaat van goede kwaliteit, geen angst behoeven te hebben voor dicyaandiamide-schade. COWIE komt in een van zijn publicaties tot dezelfde slotsom.

## HOOFDSTUK VII

# ENKELE ASPECTEN VAN HET KALKSTIKSTOFVRAAGSTUK IN DEN LANDBOUW

### § 1

Voor het overdragen van de meer theoretische gegevens op de bemesting met kalkstikstof in de practijk kunnen we aansluiten bij hetgeen hierover medegedeeld wordt door vroegere onderzoekers.

Daar het cyaanamide zoo kort mogelijk, als zoodanig, in den grond moet blijven bestaan, moet de bemesting met kalkstikstof geschieden op een grond, die voldoende water bevat, het liefst verzadigd tot 50–60 % van de watercapaciteit. In het voorgaande werd aannemelijk gemaakt dat kalkstikstof het beste zou werken op in goeden cultuurtoestand verkeerende gronden met een hoog gehalte aan actief materiaal. Dit is in overeenstemming met hetgeen REMY hierover meedeelt (64): „Am günstigsten wirkte der Kalkstickstoff auf tonreichen Böden, wo er in Bezug auf Wirkungsgrad und -geschwindigkeit nur wenig hinter dem Chilisalpeter zurückblieb." In tegenstelling met zandgronden, waar dit wèl het geval was, konden „schädliche Nebenwirkungen selbst bei Verwendung von verhältniszmäszig starken Kalkstickstoffgaben nicht beobachtet werden". Daarom: „Vorsicht bei der Verwendung von Kalkstickstoff dürfte bei leichten Böden geboten sein." Nu blijkt het, dat dit in zijn algemeenheid niet voor elken „lichten" grond geldt. Bij onze proeven met den Laboratoriumzandgrond (L 32) bleek van een schadelijke werking op de groeiende plant niets, zelfs niet bij een hooge gift van 500 kg per ha, mits men zich hield aan den regel, dat zaaien of pooten eenige dagen nà het uitstrooien van de meststof dient te geschieden.

Grondsoort voor grondsoort moet worden nagegaan hoever men met een kalkstikstofbemesting kan gaan. Voorloopig kan men aannemen, dat de volgende hoeveelheden verantwoord zijn:

100–200 kg per ha (= 20–40 kg N) voor *armen* zandgrond,
tot 300 kg per ha (= tot 60 kg N) voor *goeden* zandgrond,
tot 500 kg per ha (= tot 100 kg N) voor *lichte* tot *zware* kleigronden.

Naast de noodzakelijkheid van voldoende water in den grond komt voor een succesvolle kalkstikstofbemesting de voorwaarde van innige

vermenging van de meststof met den grond. Het zonder meer uitstrooien en niet onderwerken is volkomen fout te noemen en wel om de volgende redenen. Ten eerste blijft het cyaanamide hierdoor onttrokken aan het contact met het actieve materiaal in den grond, waardoor de gewenschte omzetting in ureum uitblijft. Ten tweede zal een gedeeltelijke polymerisatie van het cyaanamide tot dicyaandiamide mogelijk zijn omdat de pH in het dunne laagje grond + kalkstikstof langen tijd te hoog blijft indien de meststof na uitstrooien op den grond blijft liggen.

De temperatuur zal, zelfs in het vroege voorjaar, hoog genoeg zijn om een goede afbraak tot ammoniak mogelijk te maken. Aan de minimumtemperatuur van 10 °C dient echter zooveel mogelijk de hand te worden gehouden. In lijnrechte tegenspraak met de opvatting van ouderen datum is onze conclusie, dat voor een goede afbraak van kalkstikstof hooge temperaturen het meest gewenscht zijn. De opvatting van WAGNER (85) als zouden „Kohlensäure, Humussäure und Wärme den Uebergang eines Teiles seiner N. (nl. die van de kalkstikstof) in die pflanzenschädigende Verbindung Dizyandiamid begünstigen", is dan ook onjuist en met de feiten in tegenspraak, mits een hooge temperatuur niet samengaat met een te drogen grond.

Dat kalkstikstof op zwaardere gronden en op gronden, die in een goeden cultuurtoestand verkeeren (zelfs als het zandgronden zijn) goed als N-meststof te gebruiken is, staat als een paal boven water. Meer is in de literatuur te doen geweest over de werking van deze meststof op lichte en armere gronden. We moeten bij de beoordeeling hiervan voor deze gronden allereerst een scheiding maken tusschen ammonificatie en nitrificatie van kalkstikstof. Door ons werd reeds aangetoond, dat vrijwel alle bruikbare cultuurgronden voldoende zijn toegerust met actief materiaal om een goede ammonificatie mogelijk te maken. Bij de nitrificatie gaat de schoen wringen. Wanneer de grond te zuur is, is nitrificatie in het algemeen niet meer mogelijk; ook die van kalkstikstof niet, al gebeurt het meermalen, dat een flinke gift den reactietoestand zóódanig verandert, dat nitrificatie van zwavelzuren ammoniak in dezen grond niet plaats vindt, die van kalkstikstof wèl. MÜNTER (53), kennelijk werkend met een (voor de nitrificatie) tè zuren grond, stelde vast, dat zure gronden ongeschikt zijn voor bemesting met kalkstikstof.

Zooals uit onze onderzoekingen is gebleken zullen zure gronden in 't algemeen de omzetting van cyaanamide in ureum gunstig beïnvloeden. Is de pH van dergelijke gronden nog geschikt voor de nitrificeerende bacteriën, dan zal kalkstikstof op zulke zure gronden wèl een goede werking als N-meststof te zien geven. Onderzoekingen van SCHMITT (73) en RÖSZLER (69) toonden dit overduidelijk aan met behulp van uitgebreide veld- en potproeven. KUBIENA (38) verklaart dit eveneens uit de aanwezigheid van een voldoende hoeveelheid actief materiaal,

naast een reactieverbeterende werking en een gunstigen invloed van kalkstikstof op den groei van de micro-organismen, bij welken laatsten invloed de nitrificeerende bacteriën even afzonderlijk bekeken moeten worden, aangezien kalkstikstof (Ca-cyaanamide meer in het bijzonder) géén gunstigen invloed heeft op deze laatstgenoemde groep van bacteriën. Deze ongunstige invloed valt echter weg wanneer het cyaanamide zoo snel mogelijk in ureum kan worden omgezet.

Het is, naar aanleiding van veld- en potproeven, in de literatuur wel gebruikelijk een werkingsfactor voor de verschillende meststoffen aan te geven. Wanneer deze cijfers den schijn van algemeene geldigheid krijgen, is dit streven volkomen verkeerd te noemen. Komt de kalkstikstof er in het eene geval ongunstig af, b.v. als volgt: „Die Prüfung der Düngewirkung der Kalkstickstoff durch Gefäszversuche ergab, dasz wenn man der Düngewert des Salpeter-N gleich 100 setzt, der Düngewert des im Kalkstickstoff enthaltene N = 90 betragen hat" (85), dan kan men daar onmiddellijk tegenover stellen het geval dat STEGLICH (77) meedeelt. Hierbij gaf mosterd op „lichten, leemigen zandgrond" met een kalkstikstofbemesting een relatieve opbrengst = 122, wanneer die met chilisalpeter = 100 gesteld werd. Nog gunstiger komt kalkstikstof eraf bij een proef van de Rijkslandbouwproefvelden N.W.-Gelderland (26). Zie tabel 29.

TABEL 29

*Gemiddelde zaadopbrengst rogge in kg/ha*

| bemesting | 2 × geschoffeld | niet geschoffeld | verschil |
|---|---|---|---|
| Kalkammonsalpeter (kas) . . | 3190 | 2689 | + 501 |
| Kalkstikstof (kst) . . . . . | 3299 | 3009 | + 290 |

Naast de meeropbrengst t.g.v. 2 × schoffelen is de gunstige werking van kalkstikstof hier zeer opvallend.

Dit spel van voor en tegen kan alleen de principieele voor- of tegenstanders van kalkstikstof interesseeren. Op objectieve manier dient, aan de hand van goed opgezette proeven, nagegaan te worden, welke plaats aan deze meststof toekomt in de rij van N-meststoffen, meer in 't bijzonder onder Nederlandsche voorwaarden van grond en klimaat. Hierbij zal niet alleen gelet moeten worden op de opbrengst van den oogst alleen, doch ook op de meer of minder duidelijk tot den landbouwer sprekende nevenwerking van de meststoffen. Van die nevenwerkingen van kalkstikstof kunnen we noemen:

1. de onkruidbestrijdende werking,
2. de, in de meeste gevallen, gunstige Ca-werking,
3. de reinigende werking op de microflora van den grond.

*Ad* 1. Hierover zouden we, in het kader van dit geschrift, nog op kunnen merken, dat bij de techniek van onkruidbestrijding rekening dient te worden gehouden met hetgeen op blz. 73 gezegd werd over het aan de oppervlakte van den grond laten liggen van kalkstikstof. Het meest ideale gebruik ervan in de onkruidbestrijding zal dan ook zijn het land, met kalkstikstof bestrooid ter onkruidbestrijding, zoo kort mogelijk na het uitstrooien te eggen, als het dooden van het onkruid dit maar toelaat. Hiermee wordt bereikt, dat het Ca-cyaanamide, na zijn onkruidbestrijdende werking beëindigd te hebben *op* den grond, de meest gewenschte omzetting kan ondergaan *in* den grond. Alleen dient men dan rekening te houden met de aan het gewas te geven overbemesting met N. De kalkstikstof, als onkruidbestrijdingsmiddel gebruikt, dient dan als overbemesting te worden beschouwd, eventueel aangevuld met een kleine hoeveelheid N in den vorm van nitraat-meststof, voor de voorziening in de onmiddellijke behoeften van het gewas.

*Ad* 2. SCHMITT (74) onderzocht de waarde van kalkstikstof ter verkrijging van een beteren kalktoestand aan de hand van een aantal grondsoorten in veldproeven, vakkenproeven en potproeven. Door bepaling van de pH-waarden, den verzadigingsgraad, den hydrolytischen en uitwisselingszuurheidsgraad verkreeg hij een inzicht in de werking van de kalk uit kalkstikstof, welke werking werd vergeleken met die van de kalk uit koolzuren kalk, gebluschten en ongebluschten kalk. Steeds weer werd gevonden, dat een gelijke hoeveelheid kalk uit kalkstikstof een betere werking bezat, terwijl een in lagen onderzochten grond aantoonde, dat met kalkstikstof de kalk sneller den grond indrong. Kalkbepalingen in het drainvocht bevestigden deze waarneming. Bij kalistikstof verliet den cultuurpot een grootere hoeveelheid kalk met het overschot van het gietwater dan bij andere kalksoorten.

*Ad* 3. Daar kalkstikstof, zoolang het nog niet omgezet is in ureum, een reinigende werking uitoefent op de microflora, is het te verwachten, dat ook verwekkers van plantenziekten òf gedood, òf sterk in hun ontwikkeling geremd zullen worden. REINMUTH (63) geeft in het „Handbuch der Pflanzenernährung und Düngerlehre" (2e deel) van HONCAMP een samenvatting van de literatuurgegevens over de gunstige werking van kalkstikstof t.a.v. het uitschakelen van in den grond voorkomende ziekteverwekkers. Gunstige resultaten werden verkregen met kalkstikstof bij het bestrijden van Plasmodiophora brassicae (knolvoet), bij de aantasting van kiemplanten van bieten door Pythium de Baryanum en bij de bestrijding van steenbrand bij tarwe.

Volgens BOENING (8) was in met kalkstikstof bemeste bakken de aantasting van tabaksplantjes door Sclerotinia sclerotiorum [LIB.] MASSEE

veel minder hevig dan die in de niet-bemeste bakken. De ontkieming van de sclerotiën werd door kalkstikstof onderdrukt.

Ook verschillende dierlijke parasieten kunnen met succes met kalkstikstof bestreden worden (o.a. aardvlooien, engerlingen). JANKE (29) deelt mede, dat emelten goed met kalkstikstof bestreden kunnen worden.

Bij de bemesting met kalkstikstof moeten we eveneens rekening houden met het feit, dat cyaanamide een giftigen invloed heeft op kiemende zaden. Deze werking is ongeveer recht evenredig met de hoeveelheid cyaanamide die nog aanwezig is, maar ze neemt snel af naarmate de tijd tusschen de kalkstikstofbemesting en het zaaien ruimer wordt genomen (13). Dit houdt in, dat men, afhankelijk van de hoeveelheid meststof en de grondsoort, tot 14 dagen met zaaien moet wachten. Dat dit onder gunstige klimatologische omstandigheden niet altijd noodig is, bleek ons bij een bemestingsproef met kalkstikstof, waarbij bij warm weer en vochtigen grond, eenige uren na het uitstrooien en onderwerken van de meststof, stoppelknollen werden gezaaid. Het gewas kwam onbeschadigd en zonder eenige vertraging boven den grond en groeide ongehinderd op.

Volgens de meeste waarnemers wordt kalkstikstof het snelst afgebroken in gronden met een groote microbiologische activiteit. De inleidende, chemische omzettingen tot ureum verloopen in de meeste gronden zóó snel, dat binnen enkele dagen het ammoniakgehalte practisch hetzelfde is als wanneer de N aan den grond was toegevoegd in den vorm van ureum. Kalkstikstof zal dus het beste werken op gronden, die geregeld met stalmest bemest worden, gronden, die daardoor een voldoende microbiologische activiteit bezitten. Ook in verband hiermee zijn de gronden met een hoog humusgehalte aan te merken als gronden, die een kalkstikstofbemesting goed verwerken (38).

## § 2

Kalkstikstof bestaat voor het grootste gedeelte uit Ca-cyaanamide tezamen met C (koolstof) en CaO als resultaat van de bereiding. Mogelijk bevat het nog eenig calciumcarbide, het uitgangsproduct, waaraan bij de bereiding de gasvormige stikstof gebonden wordt. Het behoort geen dicyaandiamide te bevatten. Bij een goed product is $\pm$ 95 % van de totaal-stikstof cyaanamide; 1,0–1,5 % wordt teruggevonden als ureum; de rest komt waarschijnlijk voor in den vorm van nitriden, voornamelijk het nitride van kiezelzuur.

Nu is het voldoende bekend, dat kalkstikstof tijdens de bewaring in de papieren zakken, waarin het afgeleverd wordt, onder opneming van water en koolzuur uit de lucht aan veranderingen is blootgesteld.

Door de opneming van $H_2O$ en $CO_2$ ontstaan $Ca(OH)_2$ en $CaCO_3$. In het vochtige, sterk alcalische milieu wordt een gedeelte van het cyaanamide gepolymeriseerd tot dicyaandiamide en gehydrolyseerd tot ureum. Sporen van andere complexe verbindingen kunnen eveneens ontstaan. Nu bleek het aan RICHARDSON (67), dat deze omzettingen tijdens het bewaren nogal meevallen wanneer de zakken goed sluiten en dicht blijven tijdens de periode, dat kalkstikstof bewaard wordt, terwijl een droge bewaarplaats verre te verkiezen is boven een vochtige. Zoo bleek het, dat een monster, bewaard onder goede omstandigheden, na 12 maanden nog niet noemenswaard was veranderd. Zie tabel 30.

TABEL 30

*Bewaring van kalkstikstof*

| bewaring gedurende | gewicht zakken | totaal-N kalkstikstof | cyaanamide-N | ureum-N | dicyaandiamide-N |
|---|---|---|---|---|---|
| – | 100 | 100 | 94,9 | 1,1 | 0 |
| 1 maand . . . | 100,6 | 100,1 | 94,8 | 1,4 | 0 |
| 3 „ . . . | 101,6 | 98,6 | 95,6 | 2,0 | 0 |
| 6 „ . . . | 103,6 | 98,3 | 94,6 | 1,6 | 0,3 |
| 12 „ . . . | 105,5 | 97,1 | 93,7 | – | 0,6 |

naar RICHARDSON

Het groote nadeel van kalkstikstof is gelegen in de eigenschap, dat het fijne product ontzettend stuift. Door het bijtende karakter moet de persoon, die het moet uitstrooien, voorzorgen nemen, die op het bedrijf meestal niet in acht worden genomen. Bij inademing van kalkstikstof (hetgeen onvermijdelijk is zonder respirator) schijnen voor het menschelijke lichaam wel onaangenaamheden te volgen (16). Op verschillende manieren heeft men getracht de stuivende werking tegen te gaan, ofschoon de onkruidbestrijdende werking van kalkstikstof staat of valt met het stuiven. Voor bemestingsdoeleinden maakt men wel gebruik van kalkstikstof, die vermengd wordt met een kleine hoeveelheid olie. Dit product schijnt evengoed te voldoen als het ongeoliede. In de practijk is het nogal eens gebruikelijk kalkstikstof voor het uitstrooien te vermengen met superfosfaat. Dit is echter zeer sterk af te raden, aangezien een dergelijk mengsel aanleiding geeft tot het ontstaan van groote hoeveelheden dicyaandiamide.

Het stuifvrijmaken van kalkstikstof is echter een probleem, dat toch van het grootste belang is voor de waardeering van het product door den boer. Een fijne korreling zal hier de meest ideale oplossing zijn (39). Verschillende procédé's zijn hiervoor al uitgewerkt. De korreling moet echter zoodanig gerealiseerd worden, dat geen (of zoo min mogelijk) cyaanamide in dicyaandiamide wordt omgezet.

De Nederlandsche Codex-eischen, gesteld aan kalkstikstof, zijn samen

te vatten in de voorwaarde, dat minstens 85 % van de totaal-N aanwezig moet zijn in den vorm van Ca-cyaanamide. Bij dezen eisch is stilzwijgend aangenomen, dat de rest van de N uit dicyaandiamide bestaat. Wanneer we dit niet aannemen, dan veronderstellen we toch wel, dat het niet in den vorm van cyaanamide aanwezige N-gedeelte voor de bemesting ongewenscht is. Daar de chemische analyses, die ons moeten inlichten over deze kwestie kostbaar en t.a.v. het dicyaandiamide niet eens betrouwbaar zijn, hebben we een meer met de practijk overeenkomende methode uitgewerkt ter vaststelling van de waarde van kalkstikstof als meststof. Het is mogelijk gebleken om, eenerzijds, de bemestingswaarde van elk willekeurig kalkstikstofmonster te bepalen, anderzijds, uitgaande van een goed monster van deze meststof, de reactie van verschillende grondsoorten op kalkstikstof na te gaan. Ofschoon er nog niet voldoende ervaring is verkregen met deze, in de volgende paragraaf beschreven, methode, zijn er aanwijzingen, dat een uitgebreid onderzoek ermee in staat zal zijn het kalkstikstofvraagstuk, voorzoover het Nederlandsche omstandigheden betreft, geheel op te lossen.

## § 3. *Vergelijking van verschillende kalkstikstofpreparaten t.o.v. een grond, die goed reageert op een bemesting met deze meststof*

Het desbetreffende onderzoek bestaat uit drie proeven, nl.:

1. Aan telkens 100 g grond worden toegevoegd:
   een kalkstikstofhoeveelheid overeenkomend met 60 kg N per ha + 30 mg dicyaandiamide.
   Telkens na 6 uur wordt in den grond, die gebracht is op 60 % van de watercapaciteit, de ammoniakproductie bepaald. Deze mag na 2 dagen als geëindigd worden beschouwd.
2. Aan een tweede serie potjes met 100 g grond (gebracht op 60 % van de watercapaciteit) wordt dezelfde hoeveelheid kalkstikstof toegevoegd, ditmaal zonder dicyaandiamide. Een onderzoek naar de nitrificatie wordt nu ingesteld. De nitraatbepalingen geschieden met tusschenpoozen van 3 (gedurende de eerste week) en 7 dagen (na de eerste week). De nitrificatie wordt gedurende 1–1½ maand onderzocht.
3. Gelijktijdig met de voorgaande proeven wordt een serie potjes met als onder 2 behandelden grond beplant met in kwartszand voorgekiemde haver- en mosterdplantjes. Het gebruik van een voor dicyaandiamide zeer gevoelig gewas (mosterd) en een minder gevoelig gewas (haver) geeft ons een indruk van het eventueel in de kalkstikstof aanwezige (of gevormde) dicyaandiamide.
   Het planten geschiedt 4–5 dagen nadat de kalkstikstof aan den grond werd toegevoegd.

Dit onderzoek, dat veel minder kostbaar is dan het chemische, geeft ons, alhoewel na langeren tijd, een juisten indruk van de waarde van een bepaald kalkstikstofpreparaat als N-meststof. De langere duur van het onderzoek is geen bezwaar, omdat het kan geschieden onder gecontroleerde laboratoriumvoorwaarden in de wintermaanden. Voordat in het voorjaar de bemesting zal plaats vinden moet een en ander bekend zijn gemaakt. De fabrikant of importeur kan natuurlijk reeds eerder zijn monsters ter onderzoek aanbieden.

Aan de hand van de volgende proef wordt de hierboven beschreven methodiek gedeeltelijk nader toegelicht.

*Proef 18*

Vergeleken werden de volgende kalkstikstofmonsters, gebracht in Laboratoriumzandgrond (L 32):

| nummer | N-totaal | N als cyaanamide | % van N-totaal als cyaanamide |
|---|---|---|---|
| M.L. 38 . . . . . | 15,3 % | 9,3 % | 61 |
| Be 41 . . . . . | 13,6 % | 10,9 % | 80 |

De ammoniak- en nitraatcijfers zijn weergegeven in fig. 21 en tabel 31. De resultaten van de groeiwaarnemingen van haver in tabel 32.

TABEL 31

*Ammonificatie en nitrificatie van twee kalkstikstofmonsters*

| proef na | N in mg per 100 g grond | | | |
|---|---|---|---|---|
| | M.L. 38 | | Be 41 | |
| | ammoniak-N | nitraat-N | ammoniak-N | nitraat-N |
| 0 h . . . . . | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 24 h . . . . . | 4,02 | – | 5,12 | – |
| 3 dagen . . . . . | 4,30 | 0,00 | 4,88 | 0,00 |
| 7 „ . . . . . | 4,32 | 0,06 | 3,94 | 0,86 |
| 14 „ . . . . . | 4,16 | 0,22 | 2,35 | 2,36 |
| 21 „ . . . . . | 4,08 | 0,60 | 0,66 | 5,20 |
| 33 „ . . . . . | – | – | 0,00 | 5,20 |

Hieruit blijkt duidelijk de slechte nitrificatie van het monster M.L. 38. Na 21 dagen begint deze eenigszins door te komen. Het is te verwachten, dat het nitraatgehalte van dit oogenblik af voortdurend gaat toenemen. De haver op met beide monsters bemesten grond (geplant als flink ontwikkelde kiemplanten) sloeg goed aan; met Be 41 traden geen bladbe-

schadigingen op. De waarnemingen aan de plantjes op M.L. 38 volgen hieronder in tabel 32.

TABEL 32

| waarneming | 100 g grond bemest met 40 mg kalkstikstof M.L. 38 | 100 g grond bemest met 80 mg kalkstikstof M.L. 38 |
|---|---|---|
| 19 Aug. | potten bemest | idem |
| 21 Aug. | potten beplant met in kwartszand voorgekiemde haverplantjes (8 exempl.) | idem |
| 23 Aug. | dicyaandiamide beschadiging waar te nemen | idem |
| | witte vlekjes aan bladranden en -toppen | bladeren krijgen verdrogende punten |
| 26 Aug. | plantjes groeien goed door; witte verkleuring niet veel erger geworden | plantjes minder goed gegroeid; enkele gaan kwijnen |
| 28 Aug. | plantjes groeien goed door; nieuwe bladeren geen afwijkingen meer | plantjes herstellen zich; nieuwe bladeren vrijwel geen afwijkingen |

Uit tabel 32 blijkt duidelijk, dat de schade aan het gewas t.g.v. bemesting met M.L. 38 van voorbijgaanden aard is. Wanneer het gewas (graan) gezaaid wordt 10–14 dagen nadat met M.L. 38 werd bemest, is waarschijnlijk gewassenbeschadiging niet meer te vreezen. Ten aanzien van de nitrificatie ziet het er voor M.L. 38 minder gunstig uit. Wanneer we aannemen, dat de nitrificatie van M.L. 38 na het punt 21 dagen net zoo intensief tot stand komt als dat het geval was bij Be 41 (wat nog heelemaal niet zeker is), dan is de nitrificatie in elk geval al 3 weken ten achter bij die van Be 41. Een dergelijke langzame nitrificatie is voor de meeste gewassen niet gewenscht. Overigens leidt dit uitblijven van de nitrificatie niet tot N-verliezen, indien de grond voldoende adsorptief vermogen heeft. De uit de kalkstikstof afkomstige ammoniak wordt dan wel voor uitspoelen behoed.

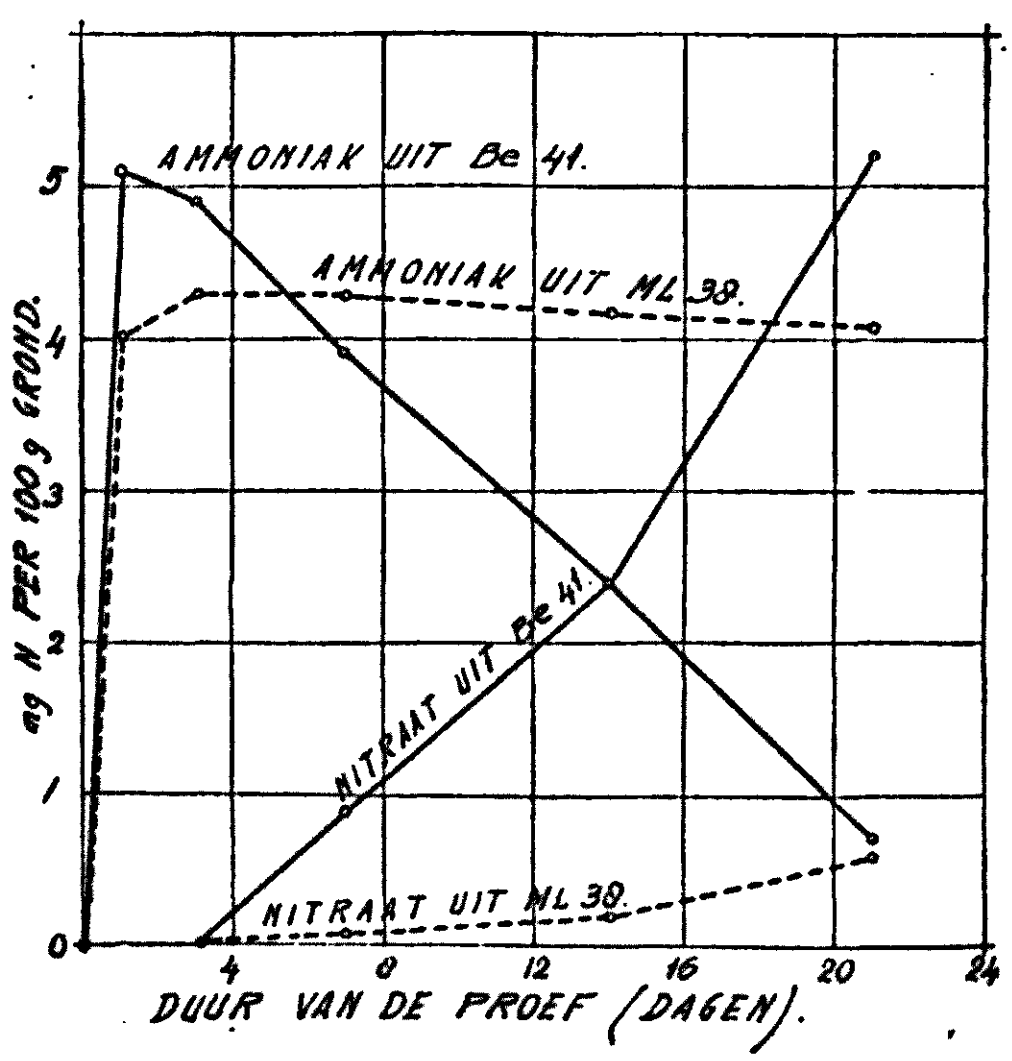



Fig. 21. Ammoniak- en nitraatvorming uit twee verschillende kalkstikstofmonsters in zandgrond L 32 40 mg kalkstikstof per 100 g grond

Beide monsters voldoen niet aan de door de Codex gestelde eischen. Be 41 echter wordt geheel genitrificeerd, en wel binnen 4 weken, nadat het aan den grond werd toevertrouwd. De eisch „minstens 85 % van de totaal-N moet aanwezig zijn als cyaanamide" is dan ook eenigszins willekeurig. Beter ware de eisch te verzwaren b.v. door te bepalen, dat minstens 90 % van de totaal-N als cyaanamide aanwezig moet zijn. De fabrikant kan hieraan voldoen, de importeur eveneens door te letten op een goeden opslag van de te distribueeren waar. Er zou een prijscorrectie aangebracht kunnen worden voor elk procent, dat minder geleverd wordt dan de eisch aangeeft. Het al dan niet afkeuren van een niet aan de Codex-eischen voldoende kalkstikstof is zonder nadere gegevens, verkregen aan de hand van een door ons omschreven onderzoek, niet goed mogelijk. De door een niet aan de eischen voldoend monster aan de plant aangerichte schade is, zooals uit ons onderzoek blijkt, een rekbaar begrip. Ter vereenvoudiging van deze kwestie zou men langs empirischen weg moeten bepalen waar de grens ligt van de tolerantie van kalkstikstofpreparaten, die niet aan de Codex-eischen voldoen. Deze grens mag niet te laag genomen worden, omdat gewassenbeschadiging door een meststof zeer ongewenscht is. Men mag aan deze kwestie zeker meer aandacht besteden dan tot nu toe het geval geweest is, omdat meermalen verkeerde meeningen zijn ontstaan over de waarde van kalkstikstof als N-meststof door een verkeerde wijze van gebruik, doch evenzeer door het voorbijzien van de kwaliteit van het uitgestrooide product. Uit de het laatst beschreven proef blijkt tenslotte duidelijk, dat een kalkstikstofbemesting van ± 50kg N per ha in den onderzochten grond (een in goeden cultuurtoestand verkeerenden, lichten zandgrond) snel en kwantitatief in nitraat wordt omgezet.

## DE KWANTITATIEVE BEPALING VAN DE VERSCHILLENDE N-VERBINDINGEN

### 1. TOTAAL-N

Bij ons onderzoek voldeed uitstekend de stikstofbepaling volgens de methode KJELDAHL-LAURO, berustend op een destructie $H_2SO_4$ en metallisch seleen, met $CuSO_4 . 5 H_2O$ als katalysator (41).

*Uitvoering der analyse:*

De te destrueeren stof (1 g stof, 5–10 g grond, of 50–100 cc grondpercolaat) wordt in de destructiekolf gebracht en hieraan wordt 4–8 g seleenmengsel [1]) toegevoegd. Door even om te schudden wordt dit met het te destrueeren materiaal gemengd. Hierbij voegt men 10–15 cc geconcentreerd $H_2SO_4$ [2]). Vervolgens wordt boven een gasvlam verhit, eerst voorzichtig en vervolgens sterker, tot de massa zacht kookt. Indien de oplossing

een helder blauwgroene tint heeft aangenomen (meestal na ongeveer 45–50 minuten) is de destructie afgeloopen. Men laat de vloeistof nu afkoelen en voegt, nog voordat het zout gaat uitkristalliseeren, ± 200 cc water toe. De gevormde ammoniak wordt nu overgedestilleerd na toevoeging van puimsteen en 50–80 cc natronloog [4]). Het destillaat wordt opgevangen in een bekend volume getitreerd zuur, waarvan de overmaat wordt teruggetitreerd [5]).

[1]) seleenmengsel: een innig gemengd mengsel van:
950 g watervrij $Na_2SO_4$,
15 g gekristalliseerd $CuSO_4$. 5 aq.,
20 g seleen.

[2]) sterk zwavelzuur (sg 1,84).

[3]) puimsteen.

[4]) NaOH-oplossing (500 g NaOH = 1000 cc).

[5]) zuur en loog van bekende sterkte ($\frac{N}{20}$ of $\frac{N}{10}$) al naar de te verwachten hoeveelheid N.

## 2. CYAANAMIDE

Cyaanamide werd door ons bepaald volgens een door veel onderzoekers gebruikte methode, berustend op het principe, dat het eerst aangegeven is door CARO (10). Het cyaanamide wordt uit de waterige oplossing neergeslagen met zilvernitraat of -acetaat in ammoniacaal milieu. Het aldus verkregen Ag-neerslag wordt na zorgvuldig uitgewasschen te zijn op N onderzocht volgens de methode KJELDAHL-LAURO (zie voren).

*Uitvoering der analyse*

10 cc der te analyseeren vloeistof (of meer wanneer gewerkt wordt met sterk verdunde cyaanamide-oplossingen) wordt in een bekerglas gepipetteerd, waarna de oplossing met verdund salpeterzuur zwak aangezuurd wordt (phenolphtaleïne als indicator). Vervolgens wordt de oplossing weer zwak alcalisch gemaakt met 2 procentige $NH_4OH$. Daarna voegt men aan de oplossing achtereenvolgens toe:

10 cc 2 % ammoniak en
50 cc $AgNO_3$-oplossing (± 0,1 N).

Het zich vormende neerslag laat men gedurende den nacht bezinken. Daarna affiltreeren op aschvrij filter (Schleicher en Schüll No 589 [3]). Het neerslag wordt uitgewasschen tot de afloopende vloeistof neutraal reageert (lakmoespapier). De laatste, eventueel nog aan het neerslag hechtende, sporen ammoniak worden nu verwijderd door droging van filter + neerslag gedurende ½ uur in een stoof bij 105 °C.

Hierna worden van filter + neerslag de N bepaald volgens methode KJELDAHL-LAURO. Door omrekening is uit het gevonden stikstofcijfer de hoeveelheid aanwezige cyaanamide te berekenen.

Een snellere methode van cyaanamide-bepaling is die volgens PEROTTI-KAPPEN (32), waarbij het cyaanamide in ammoniakaal milieu wordt neergeslagen met een bekende hoeveelheid $AgNO_3$. De niet-verbruikte hoeveelheid zilver wordt nu in het filtraat door titratie met $NH_4CNS$ bepaald. Een andere gebruikelijke variant van deze methode is die volgens PINCK (59) waarbij het Ag-cyaanamide-neerslag opgelost wordt in $HNO_3$,

waarna de hoeveelheid gebonden zilver door middel van titratie met $NH_4CNS$ wordt bepaald.

Deze titratie-methoden werden in ons onderzoek vrijwel niet gebruikt, omdat er meestal uiterst kleine hoeveelheden cyaanamide bepaald moesten worden. De kleuromslag is met verdunde (N/50 of N/100) titreervloeistoffen bij de beschreven titratie moeilijk waar te nemen. Het tijdroovender en kostbaarder werken met de eerste methode werd in verband met de nauwkeurigheid maar voor lief genomen.

## 3. UREUM

Ureum, dat in zekeren zin als sleutel tot dit onderzoek fungeerde, kan op verschillende manieren kwantitatief bepaald worden, nl.:

1. langs *directen weg*, door middel van precipiteeren van het ureum met xanthydrol (FOSSE, (14) ALLAN en LUCK (1)).
2. langs *indirecten* weg met behulp van het enzym urease, waarbij ureum omgezet wordt in ammoniumcarbonaat, waarna de ammoniak na destillatie kwantitatief wordt bepaald (methoden: *a.* COWIE (12); *b.* SCHMALFUSZ (71); *c.* FOX en GELDARD (15).

### 1. *Directe methode*

Hierbij slaat men het ureum uit zijn met azijnzuur aangezuurde oplossing neer met xanthydrol. Het di-xanthylureum wordt afgefiltreerd op een filterkroesje, gedroogd en gewogen.

Door omrekening is uit het gewicht van het neerslag te berekenen hoeveel ureum in de oplossing aanwezig was (Fosse).

Om zeer kleine hoeveelheden ureum kwantitatief te kunnen bepalen scheiden ALLAN en LUCK het dixanthylureum door centrifugeeren van het reactiemengsel en oxydeeren het met kaliumbichromaat in zwavelzuur milieu. De hoeveelheid niet-verbruikt kaliumbichromaat wordt hierna jodometrisch teruggetitreerd. Aan de hand van de verbruikte hoeveelheid bichromaat is te bepalen, hoeveel ureum aanwezig was.

De methode ALLAN-LUCK leek voor ons onderzoek wel in aanmerking te komen. Zij werd evenwel niet gebruikt in verband met chemicaliënschaarschte.

### 2. *Indirecte methode*

Van deze methode zijn verschillende uitvoeringen bekend, o.a. die volgens COWIE, FOX-GELDARD, SCHMALFUSZ. Bij ons onderzoek werd gebruik gemaakt van twee methoden, nl. die volgens:

*a.* FOX en GELDARD, berustend op directe titratie van den door de urease gevormden ammoniak. Deze methode is alleen toe te passen in niet-bufferende vloeistoffen.

*b.* SCHMALFUSZ: vacuumdestillatie van den gevormden ammoniak.

#### *a. Gewijzigde methode Fox-Geldard*

De te onderzoeken oplossing wordt zuur gemaakt (t.o.v. een mengindicator[1]), waarna het eventueel in de oplossing aanwezige $CO_2$ met behulp van het doorblazen van lucht (gedurende 5–10 minuten) verdreven wordt. De oplossing wordt hierna geneutraliseerd met verdunde loog. Vervolgens wordt een bepaalde hoeveelheid van een t.o.v. den mengindicator geneutraliseerde ureaseoplossing[2]) toegevoegd, waarna het geheel ge-

durende 1 uur bij kamertemperatuur blijft staan (of korter bij hoogere temperatuur b.v. 30–35 °C). Na deze periode wordt een overmaat zuur van bekende sterkte toegevoegd, waarna weer, ter verdrijving van het aanwezige koolzuur, gedurende 5–10 minuten lucht doorgeblazen wordt. De overmaat zuur wordt hierna teruggetitreerd met loog van bekende sterkte. 1 cc N/10 zuur komt overeen met 3 mg ureum.

Voor kleine hoeveelheden ureum gebruikten wij N/50 en N/100 zuur en loog.

[1]) Mengindicator volgens KOLTHOFF (36): Verkregen door het vermengen van 1 deel broomthymolblauwoplossing (0,1 % in water) met 1 deel broomcresol-purperoplossing (0,1 % in water). Deze mengindicator slaat in zeer verdunde oplossingen scherp om van geel (zuur) naar violetblauw (alkalisch).

[2]) *ureaseoplossing*:

*a*. een waterig extract van geprepareerd Jackbeanmeal (Arlco, Yonkers U.S.A.) naar 10 g per 50 cc water.

*b*. een voortdurend versch te bereiden oplossing van urease (gekristalliseerd) (Yonkers, U.S.A.). Gebruikte concentratie hangt af van de te verwachten hoeveelheid ureum.

Daar grondpercolaten meestal meer of minder op den voorgrond tredende bufferende eigenschappen bezitten passen we hierbij voor de bepaling van ureum toe de

*b. Gewijzigde methode Schmalfusz*

Een aliquot gedeelte van het grondpercolaat (resp. cultuurvloeistof) wordt gepipetteerd in een kolf met ronden bodem. Hieraan wordt toegevoegd (na neutraliseeren der oplossing t.o.v. den bovengenoemden mengindicator volgens KOLTHOFF) een bepaalde hoeveelheid ureaseoplossing, waarna het geheel ongeveer 1 uur bij kamertemperatuur blijft staan (of korter naarmate de temperatuur hooger genomen wordt). Vervolgens wordt ½ g MgO vermengd met de vloeistof in de kolf, waarna de kolf aangesloten wordt aan een vacuumdestillatieapparaat.

Gedestilleerd wordt nu met zooveel vacuum, dat de temperatuur van koken van de te onderzoeken oplossing ligt bij ongeveer 45–50 °C. De op de destillatie volgende titratie levert ons, na aftrek van den vóór de ureasetoevoeging in de oplossing aanwezigen ammoniak, de hoeveelheid ureum die aanwezig was.

De zoojuist beschreven methode is, door de ingeschakelde vacuumdestillatie, vrij ingewikkeld. Ze voldeed ons echter uitstekend, aangezien men in de te onderzoeken oplossingen bij een kooktemperatuur van ongeveer 50 °C onder toevoeging van MgO niet bevreesd behoeft te zijn voor secundaire, de bepaling storende, reacties.

## 4. AMMONIAK

De te onderzoeken vloeistof wordt in een destillatiekolf gepipetteerd en aangevuld met ongeveer 100 cc water. Na toevoeging van ½–1 g MgO werd gedestilleerd òf bij 100 °C, òf, indien noodig, in vacuumdestillatie-apparaat bij ongeveer 50 °C. Vervolgens wordt de, in gesteld zuur opgevangen, ammoniak titrimetrisch bepaald (met Alizarin-sulfozure natrium als indicator).

## 5. NITRAAT

Na een vooronderzoek viel onze keus op de nitraatbepaling volgens BLOM en TRESCHOW (7). Deze methode staat de bepaling toe van kleine hoeveelheden nitraat en is gemakkelijk uitvoerbaar.

De methode berust op het nitreeren (door $HNO_3$ of $HNO_2$) van het meta-2-4-xylenol in zwavelzuur milieu. Het gevormde nitroxylenol is vuilgeel gekleurd en zeer vluchtig. Deze verbinding wordt overgedestilleerd en opgevangen in een verdunde NaOH-oplossing. De Na-verbinding van nitroxylenol is heldergeel gekleurd; de intensiteit van deze gele kleur hangt (binnen bepaalde concentratiegrenzen) samen met de concentratie van het natriumzout van nitroxylenol, m.a.w. met de hoeveelheid $NO_3$ en $NO_2$, die in de oplossing aanwezig was. Deze hoeveelheid is dus d.m.v. een kolorimeter of Pulfrisch photometer te bepalen. Dit kan men doen met behulp van een voor een bepaalden kolorimeter gemaakte ijkcurve met oplossingen met bepaald $NO_3$- (resp. $NO_2$) gehalte.

Met deze methode bepaalt men dus niet alleen het $NO_3$, doch tevens het $NO_2$. Dit is echter geen bezwaar omdat de grond onder normale omstandigheden geen nitriet bevat.

*Uitvoering der analyse*

Een bepaalde hoeveelheid grondpercolaat (of andere vloeistof) wordt gepipetteerd in een destillatiekolf van 300–500 cc inhoud. Vervolgens wordt zooveel 80–85 procentig zwavelzuur toegevoegd, dat de zwavelzuurconcentratie in het mengsel $\pm$ 60 % wordt. Het zwavelzuur dient zeer zorgvuldig onder de te analyseeren vloeistof gegoten te worden, waarna onder sterke koeling gemengd wordt tot de temperatuur van het mengsel ongeveer 30 °C is. Hierna wordt 0,1 cc van een alcoholische xylenoloplossing aan het reactiemengsel toegevoegd (10 g xylenol opgelost in 100 cc 50 % alcohol). Het mengsel wordt nu gedurende ½ uur bij 30 °C weggezet, waarna de nitreering als beeindigd kan worden beschouwd. Het reactiemengsel wordt hierna verdund met 100 cc gedestilleerd water. Na de destillatie (denk om kooksteentjes!!), waarbij het nitroxylenol in een maatkolfje van 100 cc met 25 cc $N_5$NaOH wordt opgevangen, wordt de koeler goed nagespoeld met warme NaOH-oplossing. Het destillaat wordt aangevuld tot de maatstreep. Na 20–30 minuten staan in het donker wordt de vloeistof gemeten in photo- of colorimeter.

*Opmerking*. Alle beschreven analysemethodes werden voor het gebruik getoetst aan oplossingen met bekende hoeveelheden cyaanamide, ureum, ammoniak en nitraat.

## 6. DICYAANDIAMIDE

Wij zijn er niet in geslaagd een methode te vinden om kleine hoeveelheden dicyaandiamide in den grond te bepalen. De in de literatuur bekend zijnde dicyaandiamidebepalingen (67) hebben veel bezwaren, waarvan wel de voornaamste zijn dat ze niet geheel betrouwbaar zijn, uiterst moeilijk in hun uitvoering en bij kleine hoeveelheden dicyaandiamide in groote hoeveelheden vloeistof (grondpercolaten b.v.) soms heelemaal den dienst weigeren.

Na een uitgebreid vooronderzoek, waar hier niet nader op behoeft te worden ingegaan, kunnen we ons geheel en al aansluiten bij de meening van HETHERINGTON en

BRAHAM (24), dat een juiste directe kwantitatieve bepaling van het dicyaandiamide nog niet mogelijk is. Als onze eigen conclusie kunnen we hier nog aan toevoegen, dat de door BUCHANAN en BARSKY (9) beschreven indirecte bepalingswijze voor ons doel evenmin geschikt was. Het eenvoudige aftreksommetje

$$\text{totaal-N} - (\text{cyaanamide-N} + \text{ureum-N}) = \text{dicyaandiamide-N}$$

gaat tenslotte alleen maar op in niet zeer gecompliceerde oplossingen, zoodat ook deze bepalingswijze in grondpercolaten met stikstof in allerlei vormen niet uitvoerbaar was.

Daar het dicyaandiamide bij de omzetting en afbraak van kalkstikstof onder normale voorwaarden (d.w.z. pH van den grond $\leqslant$ 7–7,5; voldoend vochtige grond; niet te lage temperatuur; voldoende gehalte van den grond aan katalyseerend materiaal etc.) waarschijnlijk geen rol van beteekenis speelt, werd het ontbreken van een kwantitatieve bepalingswijze voor het dicyaandiamide niet als een bezwaar gevoeld.

## SAMENVATTING

Algemeen wordt aangenomen, dat de afbraak, in den grond, van Ca-cyaanamide tot ammoniak samengevat kan worden in de volgende drie onderdeelen:

1. Het Ca-cyaanamide hydrolyseert tot cyaanamide en Ca-hydroxyde.
2. Het cyaanamide wordt vervolgens gehydrolyseerd tot ureum.
3. Het ureum wordt tenslotte door de ureumhydrolyseerende micro-organismen omgezet in ammoniumcarbonaat.

Over de manier waarop ureum uit cyaanamide ontstaat, bestaan twee tegengestelde meeningen, nl. (hoofdstuk 1):

1. Het ureum ontstaat uit cyaanamide onder invloed van physisch-chemische krachten in den grond. Micro-organismen spelen bij deze omzetting géén rol, òf een zeer ondergeschikte.
2. Ureum wordt uit cyaanamide gevormd door micro-organismen. De, inderdaad bestaande, physisch-chemische cyaanamide-hydrolyse is, t.o.v. de biochemische, van ondergeschikte beteekenis.

Uit de beschikbare literatuurgegevens kon, zonder nader onderzoek, niet uitgemaakt worden welke zienswijze juist is.

Met een speciaal voor dit doel uitgewerkte methodiek (hoofdstuk 2), kon aangetoond worden, dat de micro-organismen uit den grond geheel gemist konden worden bij de hydrolyse van cyaanamide tot ureum (zie hoofdstuk 3, proeven 1, 3, 4 en 6), zoodat de hierboven als eerste weergegeven opvatting als juist moet worden beschouwd. Bij de afbraak van cyaanamide in den grond begint de medewerking van de micro-organismen pas bij het langs physisch-chemischen weg gevormde ureum.

Het bleek verder, dat het cyaanamide in de attractiesfeer van het actieve materiaal in den grond onder den katalyseerenden invloed van $H^+$-ionen tot ureum wordt gehydrolyseerd. Het organische, zoowel als het anorganische actieve materiaal werkt aan het tot stand komen van de ureumvorming mee. De snelheid, waarmee het cyaanamide gehydrolyseerd wordt, hangt af van:

1. De hoeveelheid actief materiaal in den grond (hoofdstuk 4, § 1, proef 8)
2. De verhouding der, aan het actieve materiaal, geadsorbeerde $H^+$- en $Ca^{++}$-ionen, in dien zin, dat bij een bezetting van het actieve oppervlak met 100 % $H^+$-ionen, de omzetting met grooter snelheid tot stand komt dan wanneer het oppervlak geheel bezet is met $Ca^{++}$-ionen (hoofdstuk 4, § 1, proeven 7 en 9).

Wanneer de grond een hoog gehalte aan actief materiaal bezit, komt de invloed van de H : Ca-verhouding minder duidelijk tot uiting dan wanneer dit gehalte laag is. De meeste cultuurgronden bezitten een voldoende hoeveelheid actief materiaal om het cyaanamide (bij bemesting met normale kalkstikstofgiften — zie hoofdstuk 7, § 1) kwantitatief in ureum om te zetten. Een voorwaarde voor dit laatste is verder een zonder stagnatie verloopende opeenvolging van de reacties cyaanamide → → ureum → ammoniumcarbonaat. Stokt het proces bij ureum (doordat er met de biologische activiteit iets niet in orde is), dan wordt uit het cyaanamide, behalve ureum, ook nog dicyaandiamide gevormd (b.v. in verhitten grond, hoofdstuk 3, § 2, proef 5). Dit zal echter in „levenden" grond niet voor kunnen komen. Dicyaandiamide-vorming, t.g.v. polymerisatie van cyaanamide, is zeer ongewenscht, omdat dicyaandiamide en haar omzettingsproducten schadelijk zijn voor het gewas (zie plaat, blz. 70) en de nitrificatie ongunstig beïnvloeden. In bepaalde concentraties kan dicyaandiamide dit proces gedurende langeren tijd geheel verhinderen (hoofdstuk 6, § 4).

Indirect kon aangetoond worden, dat men bij afbraak van cyaanamide onder optimale voorwaarden niet bevreesd behoeft te zijn voor dicyaandiamide-vorming (hoofdstuk 3, § 1). Deze optimale voorwaarden betreffen:

1. Het innig vermengen van de kalkstikstof met den grond.
2. Een voldoende vochtigheid van den te bemesten grond.
3. Een temperatuur van den grond van tenminste 10 °C.
4. Een actieve microflora.

Een schema over de omzettingen en afbraak van Ca-cyaanamide in den grond werd ontworpen, waarvoor de theoretische beschouwingen over de omzettingen van cyaanamide het uitgangspunt vormden (hoofdstuk 4, § 2, figuur 12).

Daar het duidelijk bleek, dat de cyaanamide-hydrolyse buiten de medewerking van de micro-organismen tot stand kwam, vroegen we ons af, wat dan wèl het gedrag van deze organismen t.o.v. cyaanamide is. Uit de desbetreffende literatuurgegevens kon geconcludeerd worden, dat veel micro-organismen het cyaanamide als stikstof-bron kunnen gebruiken, mits dan eveneens een koolstof-bron aangeboden wordt. De schimmel *Aspergillus niger* blijkt in staat te zijn cyaanamide, onder invloed van een in het schimmelweefsel zetelende kracht, snel in ureum om te zetten (hoofdstuk 5, § 1). Daar ook vele bacteriën uit den grond goed groeien in een oplossing die cyaanamide als stikstof-bron bevat, ligt de gedachte voor de hand, dat ook deze bacteriën in staat zijn het cyaanamide te hydrolyseeren tot ureum. Nu blijkt echter uit een groot aantal proeven,

dat de snelheid van deze bacterieele cyaanamide-hydrolyse in het niet zinkt bij die van physisch-chemischen oorsprong. Bij een kalkstikstofbemesting op een goeden cultuurgrond zal het cyaanamide zóó vlug in ureum zijn omgezet (hoofdstuk 7, § 3, proef 18), dat de micro-organismen hun medewerking hierbij niet zullen kunnen verleenen. Dit temeer omdat de microflora zich aan de bemesting met kalkstikstof moet aanpassen, aangezien deze, door den „cyaanamide-schok", aanvankelijk aanleiding geeft tot een verlaging van het kiemgetal van den grond. Deze vermindering van het aantal kiemen wordt weldra gevolgd door een explosieve vermeerdering (hoofdstuk 5, § 2). Wanneer de microflora zich aangepast heeft is inmiddels het cyaanamide verdwenen.

De werking van de micro-organismen begint dan met het hydrolyseeren van het gevormde ureum tot ammoniumcarbonaat, waarna de nitrificeerende bacteriën het mineralisatieproces voltooien. De cyaanamideschok, die bij het gebruik van een waterig kalkstikstof-extract heviger is dan bij bemesting met kalkstikstof, berokkent den nitrificeerenden bacteriën eenig nadeel. De mate van dit nadeel hangt samen met de gesteldheid van den grond. Afhankelijk van de hoeveelheid uitgestrooide meststof zal de nitrificatie van kalkstikstof eenige dagen later beginnen dan die van ammoniak of ureum (hoofdstuk 6, § 2).

Meer schade ondervindt de nitrificeerende microflora echter van dicyaandiamide in den grond (hoofdstuk 6, § 4). Deze stof ontstaat door polymerisatie van cyaanamide, o.a. in onder vochtige omstandigheden bewaarde kalkstikstof. De onder deze omstandigheden in het milieu heerschende pH (12–13), bevordert deze polymerisatie. Een droge bewaring in goed gesloten zakken beïnvloedt de kalkstikstof niét ongunstig (hoofdstuk 7, § 2).

In de literatuur is geen enkel geval bekend van dicyaandiamidevorming uit cyaanamide bij bemesting van een cultuurgrond met kalkstikstof. Het dicyaandiamidevraagstuk is er dan ook meer één van theoretische dan van practische beteekenis. Onze conclusies zijn, dat dicyaandiamidevorming bij bemesting met kalkstikstof alleen dàn maar mogelijk is, wanneer:

1. De grond een hooge pH heeft (pH 8–10) (hoofdstuk 4, § 1).
2. De ureumhydrolyseerende micro-organismen ontbreken (hoofdstuk 4, § 2).
3. De kalkstikstof tè langen tijd aan de oppervlakte van den grond blijft liggen.

In de Nederlandsche cultuurgronden zal dus, wanneer het onder 3 genoemde vermeden wordt, niet gevreesd behoeven te worden voor de vorming van dicyaandiamide.

Kalkstikstof kan gerekend worden tot de langzaam-werkende stikstof-

meststoffen. Het gebruik ervan zal, in 't bijzonder bij gewassen met een lange groeiperiode (bieten, aardappelen, winterwortelen, etc.) goede resultaten geven. Kalkstikstof bezit verder enkele gunstige nevenwerkingen (hoofdstuk 7, § 1), nl.:

1. Ca-werking, waardoor de reactietoestand van den grond verbeterd wordt.
2. Onkruidbestrijdende werking; éénjarige onkruiden worden gedood.
3. Reinigende werking op de microflora, waarbij verwekkers van plantenziekten gedood of verdreven worden.

Om de onkruidbestrijdende werking èn de stikstof-werking beide goed tot hun recht te laten komen, wordt voorgesteld de kalkstikstof zoo kort mogelijk op den grond te laten liggen. Na beëindiging van de onkruidverbrandende werking dient kalkstikstof, b.v. met behulp van een eg, met den grond vermengd te worden, omdat in het dunne laagje grond + kalkstikstof gevaar voor dicyaandiamide-vorming bestaat. De overbemesting met stikstof kan men dan beperken tot een kleine hoeveelheid nitraat-N. Deze dient om in de onmiddellijke behoeften van het gewas te voorzien (hoofdstuk 7, § 1).

Aangezien er te weinig bekend is over de reactie van verschillende grondsoorten op kalkstikstof, werd een methode uitgewerkt, waarmee het mogelijk is, in korten tijd van elke grondsoort een inzicht te krijgen over de manier, waarop kalkstikstof wordt geammonificeerd en genitrificeerd (hoofdstuk 7, § 3). Omgekeerd kan met deze methode, uitgaande van een bepaalde grondsoort, van elk willekeurig kalkstikstofmonster de bemestingswaarde bepaald worden.

De verwachting is, dat alle, in goeden cultuurtoestand verkeerende gronden, goede kalkstikstofgronden zullen blijken te zijn. De optimale meststofconcentratie zal voor elke grondsoort echter niet dezelfde zijn.

Na verwerking van de met deze methode verkregen gegevens kan tevens het beslissende woord over een eventueele dicyaandiamidevorming worden gesproken. Daar de aanwezigheid van dicyaandiamide in kalkstikstof zeer ongewenscht is, lijkt het ons beter de in Nederland aan deze meststof te stellen eisch te verzwaren in dien zin, dat tenminste 90 % van het totale stikstofgehalte aanwezig moet zijn in den vorm van cyaanamide.

## SUMMARY


It is generally assumed, that Ca-cyanamide in soil is converted into ammonia along the following stages:

1. Ca-cyanamide hydrolyses into cyanamide and Ca-hydroxide.
2. Cyanamide is subsequently hydrolysed into urea.
3. Urea is finally converted into ammoniumcarbonate by micro-organisms hydrolysing urea.

Two conflicting views exist as to the mode by which urea originates from cyanamide, viz. (Ch. 1):

1. Soil induces by means of physico-chemical action the conversion of cyanamide into urea. In this conversion micro-organisms either play no part or a minor one.
2. Urea is formed out of cyanamide by micro-organisms. The actually existing physico-chemical hydrolysis of cyanamide is when compared with the biochemical hydrolysis of minor importance.

The data available in literature did not furnish any proof as to the validity of either assumption, so further investigation was needed. By means of a method especially worked out for this purpose (Ch. 2) it could be shown that in the hydrolysis of cyanamide into urea micro-organisms might be completely lacking (vide Ch. 3, exp. 1, 3. 4 and 6). Thus the former of both views cited above has to be deemed the right one. In the decomposition of cyanamide in soil the micro-organisms do not co-operate before the formation of urea by physico-chemical means has been accomplished.

It appeared moreover that cyanamide in the sphere of action of colloidal matter in soil is hydrolysed into urea under the influence of the catalytic action of $H^+$-ions. The organic as well as the inorganic colloidal matter co-operates in the realisation of the formation of urea. The rate along which cyanamide is hydrolysed depends on:

1. The amount of colloidal matter in the soil (Ch. 4, § 1, exp. 8).
2. The ratio of the $H^+$- and $Ca^{++}$-ions adsorbed on the colloidal matter in thus far that if the active surface is completely taken up by $H^+$-ions the conversion will occur at a quicker rate than when the surface is completely taken up by $Ca^{++}$-ions (Ch. 4, § 1, exp. 7 and 9).

When the soil contains much colloidal matter the influence of the ratio H : Ca is less distinct than when the content is low. Most of agricultural soils contain a sufficient amount of colloidal matter to convert the cyanamide quantitatively into urea (as long as the fertiliser has been applied at field rate). A condition for the progress of this conversion is,

however, that no stagnation occurs in the sequence of the reactions cyanamide → urea → ammoniumcarbonate. If this progress stagnates at the urea stage (the biological activity being hampered by some means), then out of the cyanamide next to urea dicyanodiamide will be formed (f.i. in heated soil, Ch. 3, § 2, exp. 5). This, however, will not occur in „living" soil. The formation of dicyanodiamide as the result of polymerisation of cyanamide is very undesirable, as dicyanodiamide and its decomposition products are very injurious to the crop (Pl. p. 70) and act unfavourably on the nitrification. In certain concentrations dicyanodiamide may even completely inhibit this process for a long period (Ch. 6, § 4).

Indirectly it could be shown that in the decomposition of cyanamide under optimal conditions the formation of dicyanodiamide need not be apprehended (Ch. 3, § 1).

These optimal conditions consist in:

1. The intimate incorporation of the Ca-cyanamide with the soil,
2. A sufficient moisture of the soil to be fertilised,
3. A temperature of the soil of at least 10 °C.
4. An active microflora.

A scheme was drafted of the conversion and decomposition of cyanamide in soil, based on the theoretical considerations about the conversions of cyanamide (Ch. 4, § 2, fig. 12).

As it was clearly apparent that the hydrolysis of cyanamide occurred without the co-operation of micro-organisms, we had to face the question in which way these might influence the course of the ultimate decomposition. From the data in literature it may be concluded that many micro-organisms can use cyanamide as a source of nitrogen, provided that a source of carbon is offered as well. The fungus *Aspergillus niger* appears to be able, thanks to a property inherent to its mycelium, to convert cyanamide rapidly into urea. As many soil bacteria develop well in a solution which contains cyanamide as source of nitrogen, it may be readily conceived that these bacteria will be able as well to hydrolyse cyanamide into urea. A large number of experiments learn, however, that the rate of the bacterial hydrolysis is next to nothing compared with the rate of hydrolysis by physico-chemical means. When good agricultural soil has been fertilised with Ca-cyanamide, the cyanamide will be converted into urea at such a rate (Ch. 7, p. 79 exp. 18), that the micro-organisms will not take any part in it. The less so, because the microflora has to adapt itself to the manuring with Ca-cyanamide, as, as the result of the „cyanamide-shock" an initial decrease of the number of germs in the soil will be induced. This decrease will be soon followed by an explosive

increase (Ch. 5, § 2). When the microflora has adapted itself, however, the cyanamide will have disappeared.

The action of the micro-organisms begins then with the hydrolysis of the formed urea into ammoniumcarbonate, whilst the nitrifying bacteria will bring the mineralisation process to its close. The „cyanamide-shock" which is stronger after the supply of an aqueous extract of „nitrolim" than after a manuring with „nitrolim" (rude Ca-cyanamide), is somewhat injurious for the nitrifying bacteria. The degree of this injury is related with the state the soil is in. Depending on the amount of fertiliser supplied the nitrification of the Ca-cyanamide will begin some days later than the nitrification of ammonia or urea.

The nitrifying flora will, however, suffer more injury from the dicyanodiamide in the soil (Ch. 6, § 4). Polymerisation of cyanamide gives rise to this substance, a.o. in „nitrolim" stored under moist conditions. The pH (12–13) occurring under such conditions will stimulate this polymerisation. A dry storage in well closed sacks does not act unfavourably on Ca-cyanamide (Ch. 7, § 2). Not a single example is offered in literature of formation of dicyanodiamide from cyanamide after the manuring of agricultural soil with Ca-cyanamide. The problem of dicyanodiamide is thus more of theoretical than of practical significance. Our conclusions are that the formation of dicyanodiamide is only possible, when:

1. The soil has a high pH (8–10) (Ch. 4, § 1).
2. The micro-organisms which will hydrolyse urea are lacking.
3. The Ca-cyanamide remains for long on top of the soil.

In agricultural soil in the Netherlands formation of dicyanodiamide needs thus not be apprehended as long as sub 3 is avoided.

Nitrolim may be reckoned among the slowly-acting fertilisers. It will furnish good results more especially in crops with a long growth period (beets, potatoes, winter carrots etc.). Ca-cyanamide exerts moreover favourable side reactions (ch. 7, § 1) viz.:

1. A liming action, so that the reaction of the soil may be improved.
2. Eradication of weeds; annual plants being killed of.
3. A purifying action on the microflora, plant-pathogenic germs being killed of or inhibited in development.

In order to develop duly both the weed-killing action and the supply with nitrogen, it is proposed to leave Ca-cyanamide as short as possible on the top of the soil. After the weed-killing action has come to a close Ca-cyanamide has to be incorporated in the soil by means of harrowing, because in the thin layer of soil + Ca-cyanamide the risk of the formation of dicyanodiamide exists. The top dressing with nitrogen may be restricted

then to a small supply with nitrate, which will provide for the immediate need of nitrogen of the crop.

As little is known about the reaction of different types of soil on Ca-cyanamide, a method has been worked out which allows at short notice for each type of soil the ascertainment of the way in which Ca-cyanamide is ammonified or nitrified (Ch. 7, § 3). It is expected that all soils in good cultural condition will prove good Ca-cyanamide soils. The optimal concentration of the fertiliser will vary, however, for the various types of soil.

After the data furnished by this method will have been worked out, the eventuality of any formation of dicyanodiamide may be judged conclusively.

## LITERATUUR


1. ALLAN, F. W. en LUCK, J. M.: The Oxidation of Dixanthydryl urea by Means of the Dichromate Reaction. J. Biol. Chem. 82 (1929), 693.
2. ALLISON, F. E.: The effect of Cyanamide and related compounds on the Number of Microorganisms in Soil. J. Agr. Res. 28 (1924), 1159.
3. ASHBY, S. F.: Note on the Fate of Calcium-Cyanamide in the Soil, J. Agr. Sc. 1 (1905–1906), 358.
4. ASO, K.: On Manuring with Dicyanodiamide. J. Coll. Agr. Tokyo. 1 (1909), 211.
5. BAUMANN: Ber. 6 (1873), 1373.
6. BEHRENS, J.: Versuche mit Kalkstickstoff. D. Landw. Pr. (1905), 770.
7. BLOM, J. en TRESCHOW, O.: Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung kleinster Mengen von Nitraten in Böden und Pflanzen. Bodenk. u. Pfl. Ern. *A* 13 (1939), 159.
8. BOENING, K.: Zur Biologie u. Bekämpfung der Sklerotinienkrankheit des Tabaks. Phyt. Ztschr. 6 (1933), 213.
9. BUCHANAN en BARSKY: Hydrolysis and Polymerisation of Cyanamide. J. Am. Chem. Soc. 52 (1930), 195.
10. CARO, SCHUCK en JACOBY: Zur Kenntnis des Kalkstickstoffs. Z. Angew. Chem. 23 (1910), 2405.
11. COWIE, G. A.: Decomposition of Cyanamide and Dicyanodiamide in the Soil. J. Agr. Sc. 9 (1918), 113.
12. ———: Mechanism of the Decomposition of Cyanamide in the Soil. J. Agr. Sc. 10 (1920), 163.
13. CROWTHER, E. M. en RICHARDSON, H. L.: Studies on Calcium-Cyanamide I. J. Agr. Sc. 22 (1932), 300.
14. FOSSE, R.: Origine et distribution de l'urée dans la nature. Ann. Inst. Pasteur. 30 (1916), 739.
15. FOX, E. en GELDARD, W.: The Determination of Urea alone and in the Presence of Cyanamide by means of Urease. Ind. Eng. Chem. 15 (1923), 743.
16. FRANCK, H., MAKKUS, W. en JANKE, F.: Der Kalkstickstoff in Wissenschaft, Technik und Wirtschaft. Samml. Chem. u. Chem.-Techn. Vortr. Hft. 6 (1931).
17. GINA, M. en PETRIONI, R.: J. Prakt. Chem. 110 (1925), 289.
18. GERLACH, M. en WAGNER, P.: Neues über die Verwendung des Luftstickstoffes. D. Landw. Pr. 1903, 367.

19. GIBSON, T.: Factors Influencing the Decomposition of Urea in the Soil. Zentralbl. f. Bakt., 2e Abt., 18 (1930), 45.
20. GIESECKE, F. en SCHMALFUSZ, K.: Ueber die Wirkung des Kalkstickstoffs im Vergleich zu anderen Stickstoffdüngern, enz. Bodenk. u. Pfl. Ern. 1 (1936), 348.
21. GIESECKE, F. en STERZ, M.: Ein Beitrag zur Kalkstickstoffumsetzung im Boden. Bodenk. u. Pfl. Ern. 12 (1938), 10.
22. GRUBE en KRÜGER: Z. Phys. Chem. 86 (1913), 65.
23. HASELHOFF, LIEHR en FLUHRER: Versuche mit Stickstoffdüngern. D. Landw. Vers. stat. 100 (1923), 39.
24. HETHERINGTON, H. C. en BRAHAM, J. M.: The Hydrolysis and Polymerisation of Cyanamide. J. Am. Chem. Soc. 45 (1923), 824.
25. HILTNER, L. en LANG, F.: Ueber den Einflusz der Düngung, insbesondere mit Kalkstickstoff, auf die Stärke des Brandbefalls des Getreides. Mitt. d. D.L.G. 1922, 253.
26. HOGEN ESCH, J. A.: Toelichting MARO-graanfilm: „Sikkels blinken, sikkels klinken."
27. IMMENDORFF, H.: Einiges über die Verwertung des Luftstickstoffs für landwirtschaftliche Zwecke. Fühl. Landw. Ztg. 1905, 787; 794.
28. JACOB, K. D., ALLISON, F. E. en BRAHAM, J. M.: Chemical and Biological Studies with Cyanamide and some of its Transformation-products. J. Agr. Res. 28 (1924), 37.
29. JANKE, F.: Kalkstickstoff im Zuckerrübenbau. Zuckerrübenbau 22 (1940), 41.
30. KAPPEN, H.: Die Zersetzung des Cyanamids durch mineralische Bodenbestandteile. Fühl. Landw. Ztg. 59 (1910), 657.
31. ———: Die Katalyse des Cyanamids. Habilitationsarbeit, Jena 1913.
32. ———: Ueber die Veränderungen des Kalkstickstoffs. Landw. Vers. stat. 70 (1911), 454.
33. ———: Ueber die Zersetzung des Cyanamids durch Pilze. Zentralbl. f. Bakt., 2e Abt., 26 (1910), 633.
34. KAUFFUNGEN, F.: Zur weitern Kenntnis des Kalkstickstoffs, enz. Diss. Zürich 1918.
35. KINDSHOVEN: Entseuchung des Bodens und Bekämpfung der Kohlhernie mit Kalkstickstoff. Mitt. d. D.L.G. 43 (1928), 522
36. KOLTHOFF, I. M.: Die Massanalyse, IIe dl, 64. J. Springer, Berlin 1928.
37. KORFF, G. en BOENING, K.: Beiträge zur Bodenbehandlung und partiellen Bodendesinfektion. Phyt. Z. 2 (1930), 39.
38. KUBIENA, W.: Katalysatorenarmut und Bakteriengehalt des Bodens in Bezug zur Düngerwirkung des Kalkstickstoffs. Fortschr. d. Landw. 4 (1929), 617.

39. KUBIENA, W.: Düngungsversuche mit einem gekörnten Kalkstickstoff. Pflanzenbau 6 (1929), 184.
40. KUHN, J. en DRECHSEL, O.: Der Einflusz des Kalkstickstoffs auf das Bakteriengehalt des Bodens. Z. Pfl. Ern. u. Dg. *B* 7 (1928), 105.
41. LAURO, M. F.: Use of Selenium as Catalyst in Determination of Nitrogen by Kjeldahl Method. Ind. Eng. Chem. Anal. ed. 3 (1931), 401.
42. LEMMERMANN, D. en EINECKE, A.: Ueber den Einflusz einer Beidüngung mit Eisenoxyd auf die Wirkung des Kalkstickstoffs, enz. Mitt. d. D.L.G. 1918, 574.
43. LOEHNIS, F.: Ueber die Zersetsung des Kalkstickstoffs. Zentralbl. f. Bakt. 2e Abt. 14 (1905), 87; 389.
44. ———: Neue Untersuchungen über die Zersetzung und die Wirkung von Kalkstickstoff und Stickstoffkalk. Fühl. Landw. Ztg. 57 (1908), 15.
45. ———: Handbuch der Landwirtschaftlichen Bakteriologie (1910), 590.
46. ———: Die Ammonifikation des Cyanamids. Z. f. Gärungsphys. 5 (1914), 16.
47. LOEW, O.: Ist Dicyandiamid Gift für Feldfrüchte? Chem. Ztg. 33 (1909), 21 en idem, 32 (1908), 676.
48. LOOSJES, R.: pH-meting in suspensies. Diss. Utrecht (1942).
49. MARSHALL, C. E.: Colloids in Agriculture. Edw. Arnold Co, London 1935.
50. MAZÉ, P. VILA en LEMOIGNE, M.: Transformation de la cyanamide en urée par les microbes du sol. Compt. Rend. Acad. Sc. (Paris), 169 (1919), 921.
51. ———: Action de la cyanamide et de la dicyanodiamide sur le développement de maïs. Compt. Rend. Acad. Sc. (Paris) 169 (1919), 804.
52. MORELL, G. F. en BURGEN, P.: The Polymerisation of Cyanamide. J. Chem. Soc. 105 (1914), 576.
53. MÜNTER, F.: Ueber Versuche mit Nitrophoska. D. Landw. Pr. 1927, 715.
54. MUKERJI, B. K.: Studies on Calcium-Cyanamide, II. J. Agr. Sc. 22 (1932), 355.
55. MULDER, E. G.: Over de beteekenis van koper voor den groei van planten en microörganismen. Diss. Wageningen (1938).
56. PALLMANN, H.: Die Wasserstoffaktivität in Dispersionen und Kolloiddisperse Systemen. Koll. Beihefte, 30 (1930), 334.
57. PEROTTI, R.: ref. in J. Agr. Res. 28 (1924), 37.
58. ———: Ueber die Dizyandiamidbakterien. Zentralbl. f. Bakt., 2e Abt., 21 (1908), 200.

59. PINCK, L. A.: Ind. Eng. Chem. 17 (1925), 459.
60. PRANKE, E. J.: Cyanamid, its Manufacture, Chemistry and Uses. Chem. Pub. Co. Easton. Pa. 1913.
61. RATHKE: ref. KAUFFUNGEN, diss. Zürich 1918.
62. RATHSACK, K.: Die Ammoniak- und Nitratbildung aus Kalkstickstoff in Abhängigkeit von der Düngungskonzentration. Bodenk. u. Pfl. Ern. 11 (1938): 237.
63. REINMUTH, E.: ref. HONCAMP, F., „Handbuch der Pflanzenernährung und Düngerlehre", dl. II, 876. J. Springer, Berlin 1931.
64. REMY, TH.: Ueber die Wirkungen des Kalkstickstoffs auf verschiedenen Bodenarten. Fühl. Landw. Ztg. 56 (1907), 181.
65. RHODIN, S.: ref. SMOCK (zie 75).
66. RICE, F. E. en OSUGI, S.: The Inversion of Cane Sugar by Soils and allied Substances and the Nature of Soil Acidity. Soil Sc. 5 (1918), 333
67. RICHARDSON, H. L.: Studies on Calcium-Cyanamide, III. J. Agr. Sc. 22 (1932), 398.
68. RIPPEL, A.: Vorlesungen über Bodenmikrobiologie. J. Springer, Berlin 1933.
69. ROESZLER, H.: Kann Kalkstickstoff auf austauschsauren Mineralböden verwendet werden? D. Landw. Pr. 54 (1927), 73, 86.
70. ROTINI, O. T.: Die Faktoren des Kalkstickstoff-Umsetzung im Boden. Bodenk. u. Pfl. Ern., 65 (1941), 357.
71. SCHMALFUSZ, K.: Der Abbau des Cyanamids. Bodenk. u. Pfl. Ern., 54-55 (1938), 273.
72. ———: Ueber die Wirkung des Kalkstickstoffs u.a. Stickstoffdüngern auf die biologische Tätigkeit des Bodens. Bodenk. u. Pfl. Ern., 2 (1937), 110.
73. SCHMITT, L.: Ueber den Einflusz der Kalkstickstoffdüngung auf den Ertrag, enz. Bodenk. u. Pfl. Ern., B 10 (1931), 1.
74. ———: Die Neutralisationskraft des Kalks im Kalkstickstoff und seine Wert für kalkarme Böden. Landw. Jb. 90 (1940), 744.
75. SMOCK, R. M.: Some Physiological Studies with Calcium-Cyanamide and certain of its Decomposition products. Ohio Agr. Exp. Stat. 555 (1935).
76. SOEHNGEN, N. L.: Ureumspaltung bei Nichtvorhandensein von Eiweisz. Zentralbl. f. Bakt., 2e Abt., 23 (1909), 91.
77. STEGLICH: Ueber Düngungsversuche mit Kalkstickstoff, Stickstoffkalk, enz. Fühl. Landw. Ztg. 56 (1907), 769.
78. STUTZER en REIS: Untersuchungen über Kalkstickstoff, enz. J. f. Landw. 58 (1910), 65.
79. TAUSS, S.: zie HONCAMP, dl. II (zie ook 63), 516.
80. TENDELOO, H. J. C.: Kolloidchemie, 58. Noorduyn en Zn, Gorinchem 1944.

81. ULPIANI, C.: ref. Zentralbl. f. Bakt., 2e Abt., 19 (1907), 337.
82. ———: ref. Zentralbl. f. Bakt., 2e Abt., 22 (1909), 456.
83. ———: Gazz. Chim. Ital. 28 II (1908), 358.
84. ———: Gazz. Chim. Ital. 40 I (1910), 613.
85. WAGNER, P.: Die Verwendbarkeit des Kalkstickstoffs zur Düngung der Kulturpflanzen. Landw. Vers. stat. 66 (1907), 331.
86. WAKSMAN, S. A.: Principles of Soil Microbiology IInd Ed. Williams and Wilkins Co, Baltimore 1932.
87. WIENHUES, F.: Zur Kenntnis der Umsetzung des Kalkstickstoffs im Boden. Bodenk. u. Pfl. Ern. 66–67 (1940), 417.
88. WOLFF, G. en WOLFF, A.: Ueber den Einflusz des Kalkstickstoffs auf die Mikroflora des Bodens. Zentralbl. f. Bakt.. 2e Abt., 81 (1930), 221.