

NOTA 1012

Oktober 1977

Instituut voor Cultuurtechniek en Waterhuishouding
Wageningen

ALTERRA
Wageningen Universiteit & Research centre
Omgevingswetenschappen
Centrum Water & Klimaat
Team Integraal Waterbeheer

DE INVLOED VAN EEN AANTAL FACTOREN OP DE DENITRIFICATIE
(Een literatuurstudie)

ir. J.H.A.M. Steenvoorden

Nota's van het Instituut zijn in principe interne communicatiemid-
delen, dus geen officiële publikaties.
Hun inhoud varieert sterk en kan zowel betrekking hebben op een
eenvoudige weergave van cijferreeksen, als op een concluderende
discussie van onderzoeksresultaten. In de meeste gevallen zullen
de conclusies echter van voorlopige aard zijn, omdat het onderzoek
nog niet is afgesloten.
Bepaalde nota's komen niet voor verspreiding buiten het Instituut
in aanmerking.

I N H O U D

	pag.
1. INLEIDING	1
2. HET DENITRIFICATIEPROCES	2
3. DE INVLOED VAN ENKELE FACTOREN OP DE DENITRIFICATIESNELHEID	4
3.1. Organische stof	4
3.2. Nitraatconcentratie	7
3.3. Temperatuur	9
3.4. Zuurgraad	14
3.5. Overige bepalingen	18
4. SAMENVATTING	19
5. UIT TE VOEREN ONDERZOEK	21
6. LITERATUUR	23
1 BIJLAGE: Overzicht uit de literatuur van de resultaten van een aantal denitrificatie experimenten met grond	

ALTERRA;
Wageningen Universiteit & Research centr.
Omgevingswetenschappen
Centrum Water & Klimaat
Team Integraal Waterbeheer

1. INLEIDING

Denitrificatie is het proces waarbij nitraat wordt gereduceerd tot gasvormige stikstofverbindingen. Doorgaans wordt hiermee het biochemisch proces bedoeld, ofschoon er aanwijzingen zijn dat er ook langs chemische weg denitrificatie kan plaatsvinden (BROADBENT and CLARK, 1965)

Aan het denitrificatieproces is de afgelopen decennia bijzonder veel aandacht besteed vanuit het landbouwkundig onderzoek omdat belangrijke hoeveelheden stikstof uit kunstmest en organische mest via dit proces verloren gingen naar de atmosfeer. Recent is echter meer onderzoek op gang gekomen naar de betekenis van het denitrificatieproces voor de vermindering van de stikstofbelasting van grond- en oppervlaktewater (VAN KESSEL, 1976; Gambrell e.a., 1975; LIND, 1976).

Bij het waterkwaliteitsonderzoek neemt nitraat een voorname plaats in, omdat een belangrijke vervuiling op kan treden als gevolg van uitspoeling uit bemeste landbouwgronden en door lozingen van stikstofhoudend afvalwater. De belangen van bijvoorbeeld natuurbeheer, recreatie en drinkwatervoorziening kunnen hierdoor worden geschaad.

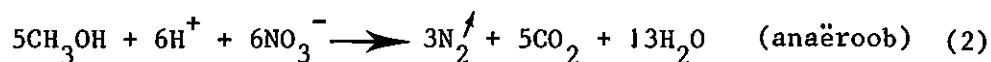
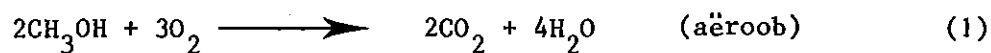
Voor het berekenen van de gevolgen van een nitraatvervuiling voor de kwaliteit van grond- en oppervlaktewater op een andere plaats is, behalve kennis van de hydrologie, eveneens inzicht vereist in de factoren die het denitrificatieproces beïnvloeden. Daarom zal in hoofdstuk 3 worden ingegaan op de effecten van organische stof, nitraatgehalte, temperatuur en zuurgraad op de denitrificatiesnelheid.

Bij het denitrificatieproces zijn een aantal deelprocessen te

onderscheiden, waarbij tussenprodukten worden gevormd. De deelprocessen, de geanalyseerde stikstofverbindingen en de wijze waarop de denitrificatiesnelheid door de verschillende onderzoekers is berekend zullen in hoofdstuk 2 worden behandeld. Op grond van uit de literatuur verkregen informatie, zal in hoofdstuk 8 worden nagegaan aan welke factoren en aspecten aandacht moet worden besteed bij het denitrificatie onderzoek.

2. HET DENITRIFICATIEPROCES

De belangrijkste voorwaarden voor het optreden van denitrificatie zijn, dat er een tekort aan zuurstof moet bestaan en dat voldoende organische stof beschikbaar is, die biologisch afbreekbaar is. De bacteriën die van belang zijn voor de denitrificatie krijgen onder aerobe omstandigheden hun energie uit de oxydatie van organische stof met behulp van vrije zuurstof in de lucht. Indien een zuurstoftekort ontstaat, doordat de zuurstofconsumptie de zuurstofaanvoer overtreft, kunnen deze organismen gebruik maken van de gebonden zuurstof in het NO_3^- -molecuul. De reacties die optreden in het geval van oxydatie van methanol zijn:



Uit reactie (2) blijkt dat denitrificatie een zuurgraadverhogend effect heeft.

Een minder belangrijke voorwaarde voor de denitrificatie is dat een geschikte bacteriepopulatie aanwezig dient te zijn. Aanwijzingen, dat ook op grote diepte in de ondergrond bacterieactiviteit verwacht mag worden, zijn te vinden in de produktie van moerasgas op soms tientallen meters diepte, de H_2S -geur van grondwater tot op grote diepte. Een directe indicatie, dat denitrificatie ook op grotere diepte kan optreden, levert het geo-chemisch onderzoek (MEINARDI, 1974; LIND, 1976).

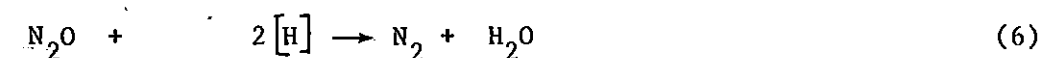
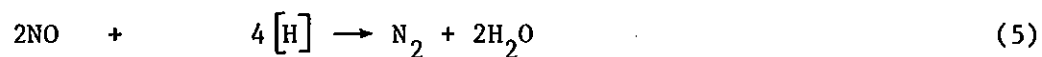
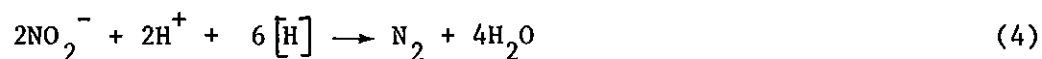
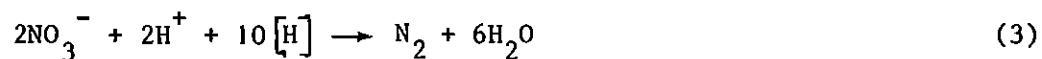
De reductie van NO_3^- tot N_2 -gas vindt plaats in een aantal stappen, waarbij als tussenprodukten gevormd kunnen worden: NO_2^- , NO en N_2O . Nog steeds is niet helemaal zeker langs welke weg NO_3^- wordt gereduceerd tot N_2 . De meest waarschijnlijke volgorde waarin de verbindingen worden gevormd is: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ (VAN VEEN, 1976)

Aangezien niet alle deelprocessen met dezelfde snelheid verlopen, kunnen soms tussenprodukten accumuleren. Om een juist beeld te hebben van het verloop van het denitrificatieproces kan het dus gewenst zijn om alle N-verbindingen te analyseren. In de literatuur wordt van verschillende analysemethoden gebruik gemaakt om de denitrificatiesnelheid te meten (bijlage 1):

- analyse van NO_3^-
- bepaling van mineraal-N ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+$)
- meten van de produktie van N_2O en N_2 , eventueel met behulp van de isotoop N^{15}

Indien men alleen NO_3^- analyseert, zal men de denitrificatiesnelheid overschatten in het geval dat accumulatie optreedt van NO_2^- , NO en N_2O . Bij de bepaling van mineraal-N kan men de denitrificatie onderschatten, aangezien de N afkomstig van NO_2^- en NH_4^+ bij de berekening beschouwd wordt als NO_3^- -N. Ook de meting van alleen de produktie van N_2O en N_2 kan tot onderschatting aanleiding geven. De feitelijke fout die gemaakt wordt bij de berekening, indien niet alle van belang zijnde N-verbindingen worden geanalyseerd, hangt af van de verhouding waarin de verbindingen voorkomen.

Indien bij een experiment de verschillende N-verbindingen worden gemeten, kan de denitrificatiesnelheid worden berekend met behulp van de volgende reacties:



Als reductie van 1 molecuul NO_3^- heeft plaats gevonden tot NO_2^- resteert nog 60% van de organische stof ($[H]$) behoefte.

Uit het oogpunt van waterkwaliteit is naast NO_3^- eveneens NO_2^- van belang omdat dit in drinkwater ongewenst is. Bij denitrificatie-onderzoek dient dus bij voorkeur eveneens de NO_2^- -concentratie te worden gemeten. Met name in de beginfase (enkele dagen) van het experiment zijn verhoogde NO_2^- -concentraties te verwachten (BREMNER and SHAW, 1958-a; COOPER and SMITH, 1963).

Berekening van de denitrificatiesnelheid uit literatuurgegevens heeft, voor zover mogelijk, plaats gevonden uit de verandering van de NO_3^- -concentratie aangezien bij de meeste experimenten alleen NO_3^- is geanalyseerd (bijlage 1).

3. DE INVLOED VAN ENKELE FACTOREN OP DE DENITRIFICATIESNELHEID

3.1. Organische stof

Organische stof kan ruwweg worden ingedeeld in de fracties: cellulose, lignine, koolhydraat en eiwit. De onderlinge verhouding waarin ze voorkomen is niet constant. Voor elk van de fracties geldt een andere afbraaksnelheid. De denitrificatiesnelheid wordt dus niet alleen bepaald door de hoeveelheid organische stof maar ook door de aard ervan.

Bij een aantal experimenten heeft men, naast de beschikbare organische stof van de bodem zelf, gezorgd voor een additionele C-bron door toevoeging van bijvoorbeeld glucose of lucerne (bijlage 1). Dit kan dienen om de denitrificatiesnelheid te verhogen, of om praktijksituaties te simuleren zoals in geval van lucerne. Toediening van een extra C-bron kan echter ook andere processen in gang zetten zoals N_2 -fixatie indien het C/N-quotient bepaalde waarden overschrijdt. In het algemeen kan voor grond worden gesteld, dat stikstof van elders benodigd is indien de C/N-verhouding groter is dan 20-30 (VAN VEEN, 1977). Bij gebruik van glucose vonden BREMNER and SHAW (1958-a) dat de optimale C/N-verhouding 2 à 3 bedroeg.

Een nevenproces dat zich tijdens de denitrificatie voor kan doen is de vorming van NH_4^+ uit bacterie eiwit.

BREMNER and SHAW (1958-b) vonden dat de NH_4 -produktie wordt beïnvloed door de C/N-verhouding. Bij C/N-quotiënten van 1, 3, 5 en 10 (verkregen door toevoeging van glucose) werd resp. 3, 4, 10 en 15% van de verdwenen NO_3 -N teruggevonden in de vorm van NH_4 . Een zelfde effect is geconstateerd door STANFORD e.a. (1975-a). Extra toevoeging van glucose boven een C/N-verhouding van 3 resulteerde in een toename van de NH_4 -produktie (tabel 1).

Tabel 1: De invloed van de C/N-verhouding op de in 16 uur geproduceerde NH_4^+ -N (in $\mu\text{gN/g}$ grond) voor een aantal bodemtypen (STANFORD e.a., 1975-a, p 149)

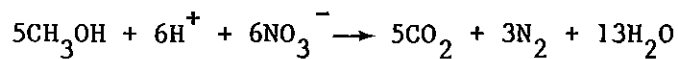
Nummer	NO_3 -N (mg/g grond)	C/N-verhouding in oplossing			
		0,38	3,0	5,6	14,3
14	105	1,7	0,9	6,2	12,3
17	85	2,3	2,6	6,2	12,5
5	85	4,9	5,7	11,4	17,0
22	92	1,9	1,8	7,9	27,7
Gemiddeld	92	2,7	2,8	7,9	17,4

Ongeveer 80% van de oorspronkelijk aanwezige NO_3 was na 16 uur verdwenen, zodat de NH_4 -N produktie varieert van gemiddeld 3,4% bij C/N=0,38 tot 20,2% bij C/N=14,3. Glucose zelf is hiervoor in belangrijke mate verantwoordelijk, zoals kan worden geconcludeerd uit een ander experiment van genoemde onderzoekers. Zonder toevoeging van glucose was na 20 uur 65 mg NO_3 -N verdwenen en 2 mg NH_4 -N gevormd, terwijl met toevoeging van glucose 83 mg NO_3 -N was omgezet en 36 mg NH_4 -N was ontstaan.

Uit metingen met N^{15} blijkt de NH_4 -N afkomstig te zijn van NO_3 . Andere onderzoekers die eveneens met N^{15} hebben gewerkt, maar zonder glucose als extra C-bron, vinden echter geen NH_4 (WYLER and DELWICHE, 1954; NOMMIK 1956) of slechts geringe hoeveelheden in de orde van grootte van ca. 2-5% van de verdwenen NO_3 -N (VAN KESSEL, 1976; TIREN, 1976). Aanwijzingen zijn gevonden dat lage NH_4 -gehalten bij de

aanvang van het experiment kan leiden tot verhoogde immobilisatie van $\text{NO}_3\text{-N}$ (VAN KESSEL, 1976). Geen verandering in de gehalten aan Kjeldahl-N (NH_4 + organisch N) kon worden aangetoond door VOLZ e.a. (1975) in een veldexperiment na 14 dagen. Het organische stofgehalte was 0,2% C en de nitraatconcentratie 100 mgN/l, zodat de C/N verhouding ongetwijfeld laag is geweest hetgeen afwezigheid van veranderingen in het gehalte aan Kjeldahl-N kan verklaren.

De hoeveelheid organische stof die theoretisch benodigd is voor denitrificatie van een bekende hoeveelheid nitraat kan worden berekend uit de structuurformule van de verbinding. Voor denitrificatie van 1 g $\text{NO}_3\text{-N}$ is bijv. van methanol nodig 1,9 g zoals kan worden afgeleid uit de reactievergelijking:



Behalve voor de energieproductie wordt organische stof eveneens gebruikt voor de produktie van celmateriaal. Ongeveer 10 à 20% van de totaal gebruikte organische stof wordt hiervoor gebruikt (VAN KESSEL, 1976).

Ter karakterisering van grond ten aanzien van de beschikbaarheid van organische stof wordt in de meeste publikaties volstaan met de vermelding van het organische stofgehalte. Een belangrijk deel van de organische stof is echter in vrij inerte toestand aanwezig. Om een indruk te krijgen van de gemakkelijk oxideerbare organische stof bepaalden STANFORD e.a. (1975-c) de extraheerbare organische stof met 0,01 M Ca Cl_2 na resp. 1 uur koken bij 100°C en 16 uur koken bij 121°C in een autoclaaf. Een groot deel van de op deze wijze geëxtraheerde organische stof bestaat uit hexosen (o.a. glucose), die door hydrolyse ontstaan zijn uit polysacchariden. De belangrijke rol die polysacchariden spelen blijkt eveneens uit de experimenten van VAN KESSEL (1976) met bodemslib. De bijdrage aan de denitrificatie van deze verbindingen was 60%, van de lagere vetzuren, met name azijnzuur, 30% en van de sulfiden ongeveer 10%. STANFORD e.a. (1975-c) vonden dan ook dat de correlatiecoëfficiënt van de denitrificatiesnelheidsconstante van 30 verschillende gronden met de geëxtraheerde glucose groter was ($r^2 = +80$) dan met het totaal organisch koolstof-

gehalte ($r^2 = 0,70$).

Bij veel gronden is de hoeveelheid oxideerbare organische stof de beperkende factor bij de denitrificatie. De denitrificatiesnelheid bij ca. 30°C, pH=6,5 à 7 en NO₃-gehalten boven 200 mgN/l in het geval geen extra organische stof wordt toegediend varieert van 17 tot 117 ugN/g grond/dag. Een relatie met het organisch stofgehalte blijkt niet altijd aanwezig (bijlage 1).

Verhoging van de beschikbare organische stof door toevoeging van glucose doet de denitrificatiesnelheid sterk toenemen. Aanvankelijke verschillen in snelheid tussen grondsoorten nemen daardoor verhoudingsgewijs sterk af (KOHL e.a., 1976). Verhoging van de glucoseconcentratie boven een C/N-verhouding van 5 à 6 doet de denitrificatiesnelheid weer afnemen (STANFORD e.a., 1975-a; bijlage 1).

3.2. N i t r a a t c o n c e n t r a t i e

Mathematisch wordt het verband tussen NO₃-concentratie en reactiesnelheidsconstante meestal op één van de volgende wijzen weergegeven:

$$0^e\text{-orde reactie} \quad \frac{-dS}{dt} = k_0$$

$$1^e\text{-orde reactie} \quad \frac{-dS}{dt} = k_1 S$$

$$\text{Michaelis-Menten reactie} \quad \frac{-dS}{dt} = k_m \frac{S}{k_s + S}$$

waarbij: S=nitraatconcentratie; t=tijd; dS/dt=nitraatomzettingssnelheid; k₀, k₁ en k_m=reactiesnelheidsconstanten; k_s=verzadigingsconstante, zodanig dat -dS/dt=½ k_m.

Bij een 0^e-orde reactie is er dus geen invloed van de nitraatconcentratie, bij een 1^e-orde reactie of een reactieverloop volgens Michaelis-Menten is er wel invloed.

Uit het gevonden mathematisch verband mogen geen conclusies worden getrokken ten aanzien van het reactiemechanisme. Indien bijvoorbeeld de relatie tussen NO₃-concentratie en reactiesnelheid kan worden beschreven met de Michaelis-Menten vergelijking mag daaruit niet worden afgeleid dat de verzadigingsgraad van het enzymcomplex hierbij een rol speelt. De verklaring kan namelijk ook zijn gelegen in de beperkte beschikbaarheid van andere voedingsstoffen.

De eerste onderzoeken naar de invloed van de NO_3^- -concentratie leidden tot de conclusie dat er geen of vrijwel geen invloed was (WYLER en DELWICHE, 1954; NOMMIK, 1956; BREMNER en SHAW, 1958-a). In recente publikaties kan de relatie over het algemeen worden beschreven door een Michaelis-Menten vergelijking (BOWMAN and FOCHT, 1974; KOHL e.a., 1976). Als waarschijnlijke verklaring van deze afwijkende conclusies kan worden genoemd het verschil in NO_3^- -concentratie. In de meer recente experimenten is de invloed nagegaan van NO_3^- -concentraties van 50 mgN/l en lager, terwijl bij de vroegere experimenten als laagste concentratie meestal \pm 250 mgN/l voorkwam (tabel 2).

Tabel 2. Overzicht van het NO_3^- -traject (mgN/l) bij een aantal onderzoeken

Onderzoek	Nitraatconcentratie
WYLER and DELWICHE (1954)	240 - 1.350
NOMMIK (1956)	90 - 1.370
BREMNER and SHAW (1958-a)	250 - 2.000
BOWMAN and FOCHT (1974)	50 - 3.000
KOHL e.a. (1976)	10 - 500

Weliswaar voerde NOMMIK (1956) zijn experimenten ook uit bij NO_3^- -concentraties van 90 mgN/l, maar de bij dit experiment gebruikte grond had bovendien slechts een geringe hoeveelheid oxideerbare organische stof. Hierdoor wordt al bij lage NO_3^- -concentraties de denitrificatiesnelheid onafhankelijk van de NO_3^- -concentratie zoals uit de experimenten van KOHL e.a. (1976) naar voren komt.

Voor de experimenten waarin de relatie tussen nitraatconcentratie en reaktiesnelheid wordt beschreven met een Michaelis-Menten curve zijn sterk afwijkende k_s -waarden berekend. KOHL e.a. (1976) berekenen voor twee verschillende gronden 4,06 en 48,7 mgN/l. BOWMAN and FOCHT (1974) komen op een k_s -waarde van 170 mgN/l. In het laatste experiment is glucose toegevoegd als additionele

C-bron. Voor een bacteriereincultuur bedroeg de waarde 0,08 mgN/l (MOORE and SCHROEDER, 1971). Als mogelijke verklaring voor de verschillen in k_s -waarde uit experimenten met actief-slib en grond geeft VAN VEEN (1976) de diffusiesnelheid aan, die in grond veel kleiner is. Uit de opzet en de resultaten van de experimenten van KOHL e.a. (1976) kan men echter de conclusie trekken dat de diffusie van NO_3 snel is vergeleken met de denitrificatiesnelheid, zodat de diffusiesnelheid niet alle verschillen kan verklaren.

De denitrificatiesnelheid in grond vertoont soms aanzienlijke verschillen, ook als men de afwijkende proefomstandigheden ten aanzien van temperatuur, zuurgraad en organische stofgehalte in rekening brengt. Waarschijnlijk kunnen ook andere voedingsstoffen dan organische stof en NO_3 een beperkende factor zijn voor de denitrificatiesnelheid. De extra toevoeging van gesteriliseerde grond aan een vaste hoeveelheid NO_3 en glucose resulteerde namelijk in een stijging van de denitrificatiesnelheid (BREMNER and SHAW, 1958-a). Welke mineralen hierbij een rol spelen is niet duidelijk. Bij een geringe beschikbaarheid van organische stof vindt men in de literatuur een maximale denitrificatiesnelheid van ca. 10 ugN/g grond/dag, die reeds wordt bereikt bij een NO_3 -concentratie van enkele tientallen mgN/l. Bij een goede beschikbaarheid van organische stof wordt de maximale waarde pas bereikt bij enkele honderden mg NO_3 -N/l. De denitrificatiesnelheid kan oplopen tot 200 à 300 ugN/g grond/dag (bijlage 1).

3.3. T e m p e r a t u u r

De temperatuur heeft een belangrijke invloed op de reaktiesnelheid van biochemische processen. Een algemeen verloop van de reaktiesnelheid met de temperatuur is weergegeven in figuur 1.

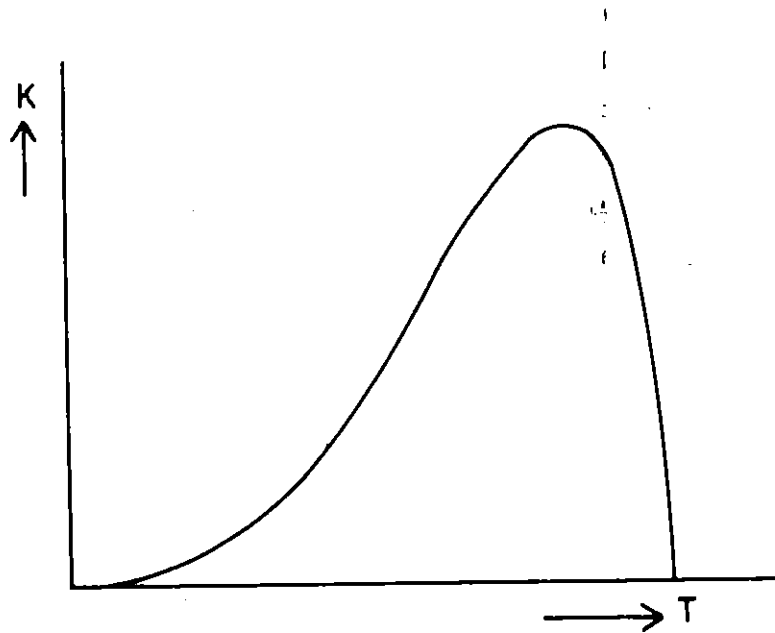


Fig. 1. Verloop van de reaktiesnelheid (K) met de temperatuur (T)

Voor het temperatuurtraject waar de reaktiesnelheid toeneemt met de temperatuur kan de relatie worden weergegeven door middel van de Arrhenius-vergelijking:

$$K = c \cdot e^{-Ea/RT} \quad (7)$$

waarin K =snelheidsconstante [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{grond} \cdot \text{dag}^{-1}$]; C =integratieconstante [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{grond} \cdot \text{dag}^{-1}$]; Ea =activeringsenergie [$\text{cal} \cdot \text{gmol}^{-1}$];
 R =gasconstante [$\text{cal} \cdot \text{gmol}^{-1} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$]; T =absolute temperatuur [$^\circ\text{K}$]

In het traject van ca. $10-40^\circ\text{C}$ kan vergelijking (7) worden benaderd door:

$$\log K = a T + b \quad (8)$$

De invloed van de temperatuur in een bepaald traject komt tot uiting in de Q_{10} -faktor. Dit is een getal dat de verhouding aangeeft tussen de reaktiesnelheid bij een bepaalde temperatuur en de temperatuur die 10°C lager is ($=K_{T+10}/K_T$). Voor veel biochemische processen bedraagt de Q_{10} voor temperaturen beneden de optimum temperatuur 2 à 3. Op eenvoudige wijze is de Q_{10} te berekenen uit (8) volgens:

$$\log Q_{10} = 10 \cdot a \quad (9)$$

In tabel 3 is een overzicht gegeven van de in verschillende onderzoeken gevonden of uit de resultaten zelf berekende Q_{10} -waarden. Tevens is informatie opgenomen over de proefomstandigheden zoals temperatuurtraject, organische stofgehalte, zuurgraad en duur van de proef.

Er is een vrij grote mate van overeenstemming over de invloed van de temperatuur indien deze is gelegen boven 10°C . De Q_{10} bedraagt dan over het algemeen 2 à 3. In het temperatuurtraject beneden 10°C worden echter grote verschillen gevonden: de Q_{10} varieert van ca. 3 tot 18. Er zijn sterke aanwijzingen dat met name de proefduur van essentieel belang is. Uit het onderzoek van DAWSON e.a. (1972) met een bacteriereincultuur blijkt dat de aanpassingstijd toeneemt met dalende temperatuur. Het verloop van de denitrificatie bij 5°C is weergegeven in fig. 2. Duidelijk blijkt dat bij een proefduur van ca. 5 dagen geen denitrificatie gemeten zou zijn.

Tabel 3. De invloed van de temperatuur op de denitrificatiesnelheid, uitgedrukt in de Q_{10} -factor, op grond van literatuurgegevens

Temp. Trajekt	Q_{10}	Materiaal			Proefduur	Bron
		Grondsoort	Org. stof*(%)	pH-water		
21 - 65	1,6	Väring grond	3,8	6,6	2-8 dgn	FOCHI (1974)
11 - 35	2,0	Hagerstown grond	1,6 (C)	6,9	2 "	STANFORD e.a. (1975)
11 - 35	2,0	Amarillo grond	5,3 (C)	6,6	2 "	"
15 - 35	2,2	Gemiddelde van 8 gronden	0,9-3,0 (C)	5,8-7,6	2 "	"
19,5- 34,5	2,0	Columbia silt loam	-	-	8 "	MISRA e.a. (1974)
20 - 30	2,9	Yolo loam	1,9	7,8	max 4 "	COOPER and SMITH (1963)
20 - 30	2,2	Milville loam	1,9	7,8	" 4 "	"
20 - 30	2,5	Manhattan silt loam	2,3	7,8	" 4 "	"
5 - 27	2,9	(Pseud. denitrificans)	-	-	12 "	DAWSON and MURPHY (1972)
4 - 21	\pm 3	Bodemslib	-	7,5-8,5	12-20 "	VAN KESSEL (1976), TIREN (1976)
5 - 15	3,4	Huron clay loam	1,6	7,2	20 "	SMID and BEAUCHAMP (1976)
5 - 11	16	Hagerstown grond	1,6 (C)	6,9	2 "	STANFORD e.a. (1975)
5 - 11	15	Amarillo grond	5,3 (C)	6,6	2 "	"
3 - 12	18	Väring grond	3,8	6,6	2- 8 "	NOMMIK (1956)
2 - 13	6-10	Clay loam	1,1 (C)	7,9	30 "	BREMNER and SHAW (1958-b)

* Indien het organische stofgehalte is uitgedrukt in elementaire koolstof staat achter het gehalte (C) vermeld.

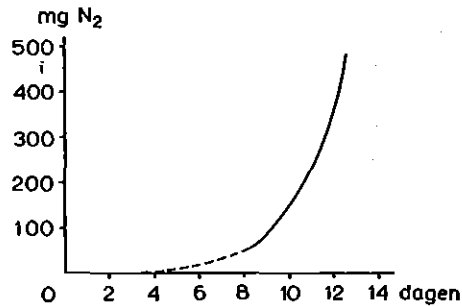


Fig. 2. Verloop van de N₂-gas ontwikkeling met de tijd bij 5°C voor *Pseudomonas denitrificans* (DAWSON e.a., 1972)

Onder veldomstandigheden is meestal een geadapteerde bacteriemassa aanwezig, omdat de omgeving gedurende maanden (bijv. bovengrond) of permanent (bijv. diepe meren) aan lage temperaturen is blootgesteld. Een indicatie in deze richting geven de onderzoeken aan bodemslib in een sloot bij 19°C door VAN KESSEL (1976) en in een diep meer bij 4°C door TIREN (1976). Uit de vermelde denitrificatiesnelheden kan een Q_{10} worden berekend van ca. 3. De nitraatconcentratie (3mgN/l) en de zuurgraad (7,5-8,5) zijn bij beide experimenten vrijwel identiek. Ten aanzien van de beschikbaarheid van organische stof mag worden aangenomen dat deze in hoge mate vergelijkbaar zijn aangezien beide wateren belast werden met effluent van een zuiveringsinstallatie voor huishoudelijk en industrieel afvalwater. Uit de gegevens kan worden berekend dat de denitrificatie in bodemslib bij 4°C 350 à 400 kg N/ha/jaar kan bedragen. Bij een waterdiepte van 1 meter komt dit overeen met een vermindering in concentratie van 35 à 40 mgN/l.

De resultaten van BREMNER and SHAW (1958-b) zijn enigszins strijdig met de hiervoor vermelde gedachten. Voor de berekening van de Q_{10} -factor (tabel 3) is uitgegaan van de denitrificatiesnelheden tussen de 20e en 30e dag. Na de 30e dag zijn de experimenten afge-

broken ook al nam de denitrificatiesnelheid bij 20°C nog steeds toe. Het is dus zeer wel mogelijk dat bij een langere proefduur een lagere Q_{10} -waarde zou zijn gevonden.

Behalve de proefduur kan ook de voorbehandeling van een grondmonster een rol spelen bij het onderzoek naar de temperatuursinvloed. De resultaten van SMID and BEAUCHAMP (1976) tonen aan dat aerobe pré-incubatie, vooral bij hogere temperaturen, invloed heeft op de denitrificatiesnelheid tijdens de proef. De invloed is het grootst voor de proef bij de laagste temperatuur. Dit wordt verklaard uit de oxidatie van organische stof tijdens de aerobe incubatie van 7 dagen, terwijl bovendien wordt geconcludeerd dat bij lagere temperaturen er relatief minder organische stof ter beschikking komt voor denitrificatie. Bij de vermelde experimenten is echter nergens een aerobe incubatie toegepast.

3.4. Z u u r g r a a d

De zuurgraad heeft een direkte invloed op de denitrificatiesnelheid. De optimum waarde voor de zuurgraad ligt bij pH=7 à 8, terwijl bij een pH van 3,5 à 4,5 meestal geen denitrificatie meer kan worden gemeten (NOMMIK, 1956; WYLER and DELWICHE, 1954; BREMNER and SHAW, 1958-b). De rol van de zuurgraad kan worden nagegaan door uit te gaan van gronden met verschillen in zuurgraad, maar eveneens door van een bepaalde grond de zuurgraad aan te passen door de toevoeging van zuur of base. Op de laatste methode hebben de gegevens in tabel 4 betrekking. Voor de vermelde experimenten zijn regressielijnen en correlatiecoëfficiënten weergegeven, uitgaande van de veronderstelling dat er een lineair verband bestaat tussen zuurgraad en denitrificatiesnelheid.

Tabel 4. De invloed van de zuurgraad (x, in pH) op de denitrificatiesnelheid (y, in ugN/g droge grond/dag) en de correlatiecoëfficiënt (r). De temperatuur varieert van 20 tot 25°C (zie bijlage 1)

Onderzoek	Regressielijn	Aantal gegevens	r ²
WYLER and DELWICHE (1954)	y=3,65x-10,9	5	0,79
NOMMIK (1956)			
Stora Bärby grond	y=6,04x-26,2	5	0,88
Ståholm grond	y=5,59x-16,7	6	0,89
BREMNER and SHAW (1958-b)	y=125,0x-566	10	0,96

In alle gevallen wordt een goede correlatie gevonden. Bij de experimenten van BREMNER and SHAW (1958-b) wordt de veel hogere denitrificatiesnelheid veroorzaakt door de toediening van een additionele C-bron in de vorm van glucose. Voor de drie overige gronden, waaraan dus geen extra C-bron is toegevoegd, is de denitrificatiesnelheid redelijk vergelijkbaar. Bij pH=7 varieert K van ongeveer 15 tot 25 ugN/g droge grond/dag (fig. 3a en b).

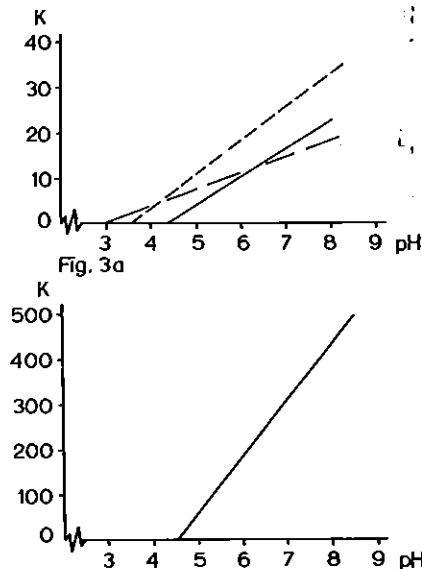


Fig. 3. De invloed van de zuurgraad (pH) op de denitrificatiesnelheid (K in ugN/g droge grond/dag) volgens: a). NOMMIK (1956) voor Stora Bärby grond (—) en Ståholm grond (----) en van WYLER en DELWICHE (1954) (— — —) en volgens: b) BREMNER en SHAW (1958-b)

Door STANFORD e.a. (1975-c) is geen invloed geconstateerd in het aanvangs pH-traject van 5,3-8,1. Aan het einde van het experiment (na 3 dgn) was het pH gebied echter versmald tot 6,0-7,5, waardoor het vaststellen van een relatie tussen pH en denitrificatiesnelheid daardoor moeilijk uitvoerbaar is. Tijdens het denitrificatieproces kan een pH-verhoging worden verwacht als gevolg van de consumptie van H^+ -ionen. Meestal bedraagt deze enkele tienden van een pH-eenheid (NOMMIK, 1956; WYLER and DELWICHE, 1954; BREMNER and SHAW, 1958-b). Een zeer grote verandering tot 1,9 pH-eenheden bij aanvangs pH-waarden van 3,5-5,8 wordt gemeld door JONES (1951) na 5 à 9 dagen.

De optimum-pH voor denitrificatie varieert met de electronen-donor (FRANCIS and CALLAGHAN, 1975). Aangezien in grond een grote verscheidenheid van organische verbindingen voorkomt, mag worden

verwacht dat voor grond niet één optimum pH-waarde bestaat, maar dat deze in ieder geval met de grondsoort zal variëren.

De wijze waarop het denitrificatieproces verloopt is nog steeds niet duidelijk. Het meest waarschijnlijke verloop en de verbindingen die hierbij worden gevormd zijn: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ (VAN VEEN, 1977). De snelheid van elke reactie wordt in verschillende mate beïnvloed door de zuurgraad. Door wijziging van de zuurgraad vindt daardoor niet alleen een verandering plaats van de totale denitrificatiesnelheid ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$), maar ook een verschuiving in de verhouding tussen de gevormde gasvormige produkten (N_2O en N_2). In zure gronden wordt meestal N_2O aangetroffen, terwijl in gronden met een pH groter dan 7 vrijwel overwegend N_2 voorkomt (NOMMIK, 1956). De geconstateerde samenstelling van het gasmengsel hangt echter in sterke mate af van het tijdstip waarop de meting wordt uitgevoerd (fig. 4).

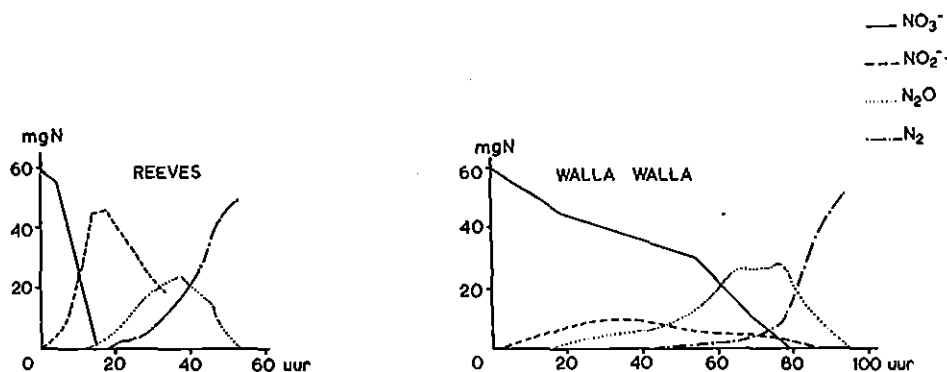


Fig. 4. Volgorde en hoeveelheid van de gevormde en gebruikte N-verbindingen bij anaerobe denitrificatie in Reeves-loam (pH=7,8) en Walla Walla silt loam (pH=6,1) bij 30°C (COOPER and SMITH, 1963)

Bij lage pH neemt wel de reaktiesnelheid af, maar uiteindelijk wordt alle NO_3^- toch omgezet in N_2 -gas (COOPER and SMITH, 1963; CADY and BARTHLOMEW, 1960). De reductie van N_2O tot N_2 lijkt pas op gang

te komen nadat vrijwel alle NO_3 is verdwenen.

BREMNER and SHAW (1958-b) constateerden dat bij anaerobe incubatie met glucose en NO_3 meer NH_4 werd geproduceerd in matig zure gronden (pH=5,8) dan licht alkalische gronden (pH=7-8). De verhouding glucose-C/N was echter verschillend en bedroeg resp. 12,5 en 7,5.

De NH_4 -vorming hangt zeer nauw samen met de hoeveelheid toegediende glucose (STANFORD e.a., 1975-a), zodat mogelijk de zuurgraad niet de verklaring is voor de verschillen in NH_4 -productie (tabel 1).

Bij pH-waarden lager dan 5,5 bestaat de mogelijkheid dat langs chemische weg NO_2^- wordt gereduceerd tot gasvormige stikstofverbindingen (BROADBENT and CLARK, 1965).

3.5. Overige bepalingen

De redox-potentiaal geeft een belangrijk antwoord op de vraag of de omstandigheden gunstig zijn voor het verloop van de denitrificatie. De redox-potentiaal geeft inzicht in de reductie-oxidatietoestand van een medium (b.v. grond) en wordt meestal gemeten met een platina electrode en een calomel referentie-electrode. De afgelezen potentiaal (E) wordt meestal gecorrigeerd ten opzichte van de standaard waterstofelectrode door er 244,4 mV (bij 25°C) bij op te tellen, zodat:

$$E_h = E + 244,4 \quad (10)$$

De processen die op kunnen treden in de verschillende E_h -trajekten worden vermeld door HOEKS (1972). Tussen 500 en 200 mV vindt denitrificatie plaats. De redox-potentiaal kan echter deze waarde hebben of lager zonder dat denitrificatie plaats vindt als gevolg van het ontbreken van organische stof. Ook het omgekeerde kan zich voordoen. Ondanks de aeratie van een bodem, die vooral door de grote poriën plaats vindt, kunnen in kleine bodemaggregaten anaerobe situaties zich voordoen, zodat denitrificatie optreedt (FOCHT, 1974).

De reductie van NO_3 gaat soms vergezeld van de vorming van belangrijke hoeveelheden Mn^{2+} en in mindere mate van Fe^{2+} . Het Fe^{2+} verschijnt pas nadat de meeste NO_3 is verdwenen (STANFORD

e.a., 1975-c). De toename van de Fe^{2+} en Mn^{2+} -concentratie hangt samen met de verandering in redox-potentiaal en zuurgraad (STUMM and MORGAN, 1975; HEM, 1970). Hierdoor verschuiven eveneens de evenwichten waar Fe en Mn bij betrokken zijn.

Als gevolg van denitrificatie treedt een pH-verhoging op. Door verschuiving van het CO_2 - HCO_3^- -evenwicht zal de HCO_3^- -concentratie stijgen en eveneens de Ca^{2+} en Mg^{2+} -concentratie.

4. SAMENVATTING

Een groot aantal onderzoekers heeft zich bezig gehouden met het onderzoek naar de biologische denitrificatie, via welk proces belangrijke hoeveelheden NO_3 kunnen worden omgezet in stikstofgas dat naar de atmosfeer ontwijkt. De experimenten zijn uitgevoerd onder soms zeer verschillende omstandigheden en ook op verschillende wijzen. Een literatuurstudie is uitgevoerd die vooral gericht is op de invloed van organische stof, nitraatgehalte, temperatuur en zuurgraad op de denitrificatiesnelheid.

Organische stof

De hoeveelheid biologisch oxideerbare organische stof is in grond veelal de beperkende factor voor de denitrificatie. Het organische stofgehalte in grond kan variëren van vrijwel afwezig tot vele tientallen procenten van de droge stof. Een belangrijk deel is echter moeilijk afbreekbaar. De karakterisering van het organische stofgehalte uit het oogpunt van denitrificatie door middel van de bepaling van 'totaal organisch C' geeft daarom geen juiste indicatie. De met water extraheerbare organische stof vertoont een betere relatie met de denitrificatiesnelheid.

Toediening van een additionele C-bron verhoogt aanvankelijk de denitrificatiesnelheid maar indien de verhouding glucose-C/N groter wordt dan 5 à 6 wordt de denitrificatie weer geremd. Bovendien kan N_2 -binding optreden. Een nevenverschijnsel van de verhoging van de hoeveelheid organische stof met glucose boven een C/N-quotient =3 is de vorming van NH_4 . Deze kan oplopen tot enkele tientallen pro-

centen van de omgezette $\text{NO}_3\text{-N}$ binnen 1 dag. Het lijkt uiterst waarschijnlijk dat dit vooral een gevolg is van de toediening van glucose. In experimenten met N^{15} waarbij geen glucose werd toegevoegd is maximaal ca. 5% van de $\text{NO}_3\text{-N}$ teruggevonden als organisch N of NH_4 .

Nitraatconcentratie

De relatie tussen NO_3 -concentratie en denitrificatiesnelheid kan mathematisch op verschillende wijzen worden weergegeven. Dit lijkt samen te hangen met het traject waarover de NO_3 -concentratie zich in het onderzoek uitstrekt. Bij lage NO_3 -concentraties wordt meestal een 1e-orde verband gevonden en bij hogere concentraties een 0e-orde verband. Indien de NO_3 -concentraties zich uitstrekken over het gehele traject kan de relatie worden beschreven volgens Michaelis-Menten.

Het verband tussen NO_3 -concentratie en denitrificatiesnelheid wordt in belangrijke mate mede bepaald door de beschikbare organische stof. Bij een geringe hoeveelheid organische stof wordt reeds bij relatief lage NO_3 -concentraties de maximale denitrificatiesnelheid bereikt. Bij toediening van extra organische stof, bijvoorbeeld in de vorm van glucose, zal de NO_3 -concentratie waarbij de maximale reaktiesnelheid wordt gemeten naar hogere waarden verschuiven.

Bij een geringe beschikbaarheid van organische stof worden denitrificatiesnelheden gevonden van max. ca. 10 $\mu\text{gN/g}$ grond/dag bij NO_3 -concentraties van enkele tientallen mgN/C . In geval van een goede beschikbaarheid van organische stof worden waarden gevonden van enkele tientallen $\mu\text{gN/g}$ grond/dag bij enkele honderden $\text{mgNO}_3\text{-N/l}$.

Temperatuur

In het traject van 0°C tot de optimum temperatuur neemt de denitrificatiesnelheid toe. De toename van de reaktiesnelheid bij een temperatuurstijging van 10°C wordt wel de Q_{10} -faktor genoemd. Voor de denitrificatie bedraagt deze boven 10°C 2 à 3. Beneden deze temperatuur zijn Q_{10} -waarden gevonden van 15 tot 18. De hoge waarden zijn afkomstig van experimenten met een proefduur van enkele dagen. Voor adaptatie aan temperaturen van $2\text{-}10^\circ\text{C}$ is echter minimaal een periode vereist van 8 à 15 dagen. Bij proeven

waar de adaptatie heeft plaats gevonden zijn bij lage temperatuur Q_{10} -waarden gevonden die weinig of geheel niet afwijken van de waarden bij hogere temperaturen.

Zuurgraad

Bij een pH-waarde van 3,5 à 4,0 of lager wordt meestal geen biochemische denitrificatie meer gemeten. In het pH-traject van ca. 4 tot 8 kan de invloed van de zuurgraad op de denitrificatiesnelheid goed worden beschreven uitgaande van een lineair verband. De relatie tussen zuurgraad en denitrificatiesnelheid kan echter per grondsoort variëren als gevolg van verschillen in de organische stof samenstelling.

Tijdens het denitrificatieproces vindt meestal een pH-stijging plaats die kan variëren van enkele tienden tot ca. 2 pH-eenheden. Door wijziging van de zuurgraad vindt eveneens een verandering plaats in de onderlinge verhouding van de gevormde stikstofverbindingen. De verhouding hangt in sterke mate af van het tijdstip van meting. Uiteindelijk lijkt toch alle $\text{NO}_3\text{-N}$ te worden omgezet in N_2 -gas.

Indien de pH daalt beneden de waarde 5,5 bestaat de mogelijkheid dat nitriet via chemische weg wordt gereduceerd tot stikstofgas.

5. UIT TE VOEREN ONDERZOEK

De denitrificatiesnelheid in grond hangt in grote mate samen met de aard en de hoeveelheid organische stof. Aangezien dit per bodemtype kan variëren is het zinvol om voor verschillende bodemtypen na te gaan welke de invloed is van nitraatconcentratie en temperatuur. Aan de karakterisering van de organische stof uit het oogpunt van denitrificatie moet aandacht worden besteed. De bepaling van met water extraheerbare glucose-verbindingen lijkt een perspectief te bieden.

Aangezien de temperatuur van het bovenste grondwater onder Nederlandse omstandigheden 5 à 10°C kan bedragen, zou de invloed van de temperatuur nagegaan kunnen worden in experimenten bij ca.

8°C en ca. 18°C.

De nitraatconcentratie in het grondwater kan oplopen tot vele tientallen mgN/l. Bij de opzet van het onderzoek dient hiermee rekening te worden gehouden.

Tijdens het experiment dient de omzetting van NO_3^- in andere N-verbindingen te worden gevolgd. Bij voorkeur dienen te worden geanalyseerd: NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , NO , N_2O en N_2 . De drie eerstgenoemde verbindingen worden gemeten in de waterfase, de laatste drie in de gasfase.

De zuurgraad dient te worden gemeten om veranderingen daarin als gevolg van denitrificatie te kunnen constateren.

6. LITERATUUR

- BAILEY, L.D. and E.G. BEAUCHAMP, 1973. Effects of temperature on NO_3^- and NO_2^- -reduction, nitrogenous gas production, and redox potential in a saturated soil. *Can. J. Soil Sc.* 53:213-218.
- BOWMAN, R.A. and D.D. FOCHT, 1974. The influence of glucose and nitrate concentrations upon denitrification rates in sandy soils. *Soil Biol. Biochem.*, 6:297-301. Pergamon Press.
- BREMNER, J.M. and K. SHAW, 1958-a. Denitrification in soil. I. Methods of investigation. *J. Agr. Sci.* 51:22-39.
- BREMNER, J.M. and K. SHAW, 1958-b. Denitrification in soil. II. Factors affecting denitrification. *J. Agr. Sci.* 51:40-52.
- BROADBENT, F.E. and F. CLARK, 1965. Denitrification. In: W.V. Bartholomew and F.E. Clark (eds). *Soil Nitrogen. Agronomy X*: 344-359.
- CADY, F.B. and W.V. BARTHOLOMEW, 1960. Sequential products of anaerobic denitrification in Norfolk soil-material. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 24:477-482.
- COOPER, G.S. and R.L. SMITH, 1963. Sequence of products formed during denitrification in some diverse Western soils. *Soil Sci. Soc. Proc.* 659-662.
- DAWSON, R.N. and K.L. MURPHY, 1972. The temperature dependency of biological denitrification. *Water Research* 6:71-83.
- FRANCIS, C.W. and M.W. CALLAHAN, 1975. Biological denitrification and its application in treatment of high-nitrate waste water. *J. Envir. Qual.* 4 (2):153-163.
- FOCHT, D.D., 1974. The effect of temperature, pH, and aeration on the production of nitrous oxide and gaseous nitrogen. A zero-order kinetic model. *Soil Science* 118, 173-179.
- GAMBRELL, R.P., J.W. GILLIAM and S.B. WEED, 1975. Denitrification in subsoils of the North Carolina Coastal Plain

- as affected by soil drainage. *J. Envir. Qual.* 4 (3): 311-316.
- HEM, J.D., 1970. Study and interpretation of chemical characteristics of natural water. 2nd. ed. U.S. Geological survey water supply paper 1473.
- HOEKS, J., 1972. Effect of leaking natural gas on soil and vegetation in urban areas. Centre for agricultural publishing and documentation, Wageningen, 120 pp.
- JONES, E.J., 1951. Loss of elemental nitrogen from soils under anaerobic conditions. *Soil Sci.* 71:193-196.
- KESSEL, J.F. VAN, 1976. Influence of denitrification in aquatic sediments on the nitrogen content of natural waters. Centre for agricultural publishing and documentation, Wageningen, The Netherlands, 104 pp.
- KOHL, D.H., F. VITHAYATHIL, P. WHITLOW, G. SHEARER and S.H. CHIEN, 1976. Denitrification kinetics in soil systems: The significance of good fits of data to mathematical forms. *Soil Sci. Soc. Am-J.* 40:249-253.
- LIND, A.M. and M.B. PEDERSON, 1976. Nitrate reduction in the subsoil. III. Nitrate reduction experiments with subsoil samples. *Tidsskrift for Planteavl.* 80 (1): 100-107.
- MEEK, B.O., L.B. GRASS, L.S. WILLARDSON and A.J. MACKENZIE, 1970. Nitrate transformations in a column with a controlled water table. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 34:235-239.
- MEINARDI, C.R., 1974. De chemische samenstelling van het grondwater van de Veluwe. R.I.D.-mededeling 74-4. 48 pp.
- MOORE, S.F. and E.D. SCHROEDER, 1971. The effect of nitrate feed rate on denitrification. *Water Research* 5:445-452.
- NOMMIK, H., 1956. Investigations on denitrification in soils. *Acta Agric. Scand.* 6:195-228.
- SMID, A.E. and E.G. BEAUCHAMP, 1976. Effects of temperature and organic matter on denitrification in soil. *Can. J. Soil Sci.* 56:385-391.

- STANFORD, G., J.O. LEGG, S. DZIENA and E.C. SIMPSON, 1975-a.
Denitrification and associated nitrogen transformations
in soils. *Soil Science* 120 (2):147-152.
- STANFORD, G., S. DZIENA and R. VAN DER POL, 1975-b. Effect
of temperature on denitrification rate in soils.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 39:867-870.
- STANFORD, G., R. VAN DER POL and S. DZIENA, 1975-c.
Denitrification rates in relation to total and extrac-
table soil carbon. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 39:284-289.
- STUMM, W. and J.J. MORGAN, 1970. *Aquatic chemistry.*
An introduction emphasizing chemical equilibria in
natural waters. Wiley Interscience, 583 pp.
- TIREN, T., J. THORIN and H. NOMMIK, 1976. Denitrification
measurements in lakes. *Acta. Agric. Scand.* 26 (3):
175-184.
- VEEN, J.A. VAN, 1977. The behaviour of nitrogen in soil.
A computer simulation model. ITAL, Wageningen. 164 pp.
- VOLZ, M.G., L.W. BELSER, M.S. ARDAKANI and A.D. MCLAREN,
1975. Nitrate reduction and associated microbial populati-
ons in a ponded Hanford sandy loam. *J. Envir. Qual.*
4 (1):99-102.
- WYLER, J. and J.J. DELWICHE, 1954. Investigations on the
denitrifying process in soil. *Plant and Soil* 5 (2):
155-169.

B i j l a g e 1. Overzicht uit de literatuur van de resultaten van een aantal denitrificatie experimenten met grond

Onderzoek	NO ₃ -conc. (mgN.l ⁻¹)	Org. stof grond (L)	Toegevoegde org. stof	Temp. (°C)	Zuurgr. (pH)	Proefduur (dag)	Denitr. snelh. (µgN/g grond dag)	Bepalingswijze denitrificatie	C/N
Balley and Beau- champ (1972, p 216)	835	1,6	-	30	7,1	24	108	NO ₃ ⁻ -analyse	-
"	"	"	-	15	"	"	25	"	-
"	"	"	-	5	"	"	2	"	-
Bowman and Focht (1974, p 298)	100	-	6000 mg/l gluc-C	25	-	1	52,5	NO ₃ ⁻ -analyse	60
"	300	-	" "	"	-	"	100	"	20
"	500	-	" "	"	-	"	123	"	12
"	1000	-	" "	"	-	"	131	"	6
Bowman and Focht (1974, p 299)	1000	-	2000 "	"	-	"	125	NO ₃ ⁻ -analyse	2
"	"	-	800 "	"	-	"	85	"	0,8
"	"	-	400 "	"	-	"	45	"	0,4
Brenner and Shaw (1958-a, p 29)	500	0,99-5,7*	5000 "	25	5,8-8,2	20	35-45	Mineraal N (NO ₃ ⁻ +NO ₂ ⁻ +NH ₄ ⁺)	10
Brenner and Shaw (1958-b, p 41)	450	2,96*	3450 "	25	4,1	30	4,7	Mineraal N	7,7
"	"	0,8 *	" "	"	5,8	5	123	"	"
"	"	1,09*	" "	"	7,7	3	267	"	"
Brenner and Shaw (1958-b, p 42)	450	1,13*	1350 "	2	7,9	30	11	Mineraal N	3
"	"	"	" "	10	"	9	90	"	"
"	"	"	" "	20	"	6	133	"	"
"	"	"	" "	30	"	3	270	"	"
Cooper and Salih (1963, p 661)	37,5	1,9	10 mg lucerne/ggr	30	7,8	0,04	44	NO ₃ ⁻ -analyse	-
"	25	"	" "	"	"	0,04	346	"	-
"	150	"	" "	"	"	0,04	46*	"	-
Kohl e.a. (1976, p 250)	50	2,4*	-	35	6,3	1	58	NO ₃ ⁻ -analyse	-
"	100	"	-	"	"	"	93	"	-
"	200	"	-	"	"	"	117	"	-
"	"	"	6000 mg/l gluc-C	"	"	"	365	"	30
"	50	2,2*	-	"	6,5	1	13	"	-
"	200	"	-	"	"	"	17	"	-
"	"	"	6000 mg/l gluc-C	"	"	"	275	"	30
Neak e.a. (1970, p 237)	20-40	-	-	25	7,4	90	0,6	NO ₃ ⁻ -bepaling	-
Noulik (1956, p 206)	90	3,8	-	21	6,6	10	8	N ₂ -en N ₂ O-prod. m.b.v. N ¹⁵	-
"	215	"	-	"	"	"	11,5	"	-
"	380	"	-	"	"	"	12,3	"	-
"	1370	"	-	"	"	"	13,5	"	-
Snid and Beau- champ (1976, p 385)	400	1,6	10 mg lucerne/ggr	5	7,2	20	1,0	NO ₃ ⁻ -analyse	-
"	"	"	" "	10	"	"	4,3	"	-
"	"	"	" "	15	"	"	8	"	-
"	"	"	" "	30	"	"	22	"	-
"	"	"	20 mg lucerne/ggr	5	"	"	13	"	-
"	"	"	" "	10	"	"	30	"	-
"	"	"	" "	15	"	"	45	"	-
"	"	"	" "	30	"	"	126	"	-
Stanford e.a. (1975-a, p 149)	52,5	5,3*	-	35	6,6	1	7,6	NO ₃ ⁻ -analyse	-
"	42,5	3,4*	-	"	6,8	"	7,6	"	-
"	42,5	13,2*	-	"	6,8	"	26,5	"	-
"	46	10,1*	-	"	6,6	"	24,3	"	-
"	49,5	24,3*	-	"	6,9	"	78,4	"	-
"	54	30,2*	-	"	6,9	"	98,5	"	-
"	52,5	5,3*	20 mg/l gluc-C	"	6,6	1	35	NO ₃ ⁻ -analyse	0,38
"	"	"	80 "	"	"	"	78	"	1,4
"	"	"	240 "	"	"	"	227	"	4,2
"	"	"	320 "	"	"	"	277	"	5,6
"	"	"	750 "	"	"	"	243	"	14,3
Stanford e.a. (1975-b, p 868)	30	0,53*	150 mg/l gluc-C	5	6,6	2	1,9	NO ₃ ⁻ -analyse	5
"	"	"	" "	10	"	"	15	"	"
"	"	"	" "	15	"	"	32	"	"
"	"	"	" "	25	"	"	65	"	"
"	50	1,64*	200 mg/l gluc-C	5	6,9	2	4	"	4
"	"	"	" "	10	"	"	45	"	"
"	"	"	" "	15	"	"	86	"	"
"	"	"	" "	25	"	"	187	"	"
Wylers and Delwiche (1954, p 165)	240	-	2 mg lucerne/ggr	20	7,7	1,5	23	N ₂ -en N ₂ O-prod.	-
"	390	-	" "	"	"	3	32	"	-
"	715	-	" "	"	"	12	43	"	-
"	1350	-	" "	"	"	23	32	"	-

* Organisch stofgehalte uitgedrukt in % org. C