

Fytotoxiciteit, nematotoxiciteit, en microbiële stabiliteit van getorreficeerd gras

Frans C. Zoon, Hans C.J. Kok & Jan J.M.H. Ketelaars





Fytotoxiciteit, nematotoxiciteit, en microbiële stabiliteit van getorreficeerd gras

Frans C. Zoon, Hans C.J. Kok & Jan J.M.H. Ketelaars

© 2006 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 47 70 00
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
1. Inleiding en achtergrond	3
2. Materialen en torrefactie	7
3. Fytotoxiciteit van grasproducten	9
3.1 Pilot-experiment fytotoxiciteit bij kiemende zaden	9
3.2 Fytotoxiciteit van gras- en rietextracten met en zonder pH-correctie	12
3.3 Fytotoxiciteitsproeven bij tomaat en chrysant in grond	14
4. Effecten van grasextracten op nematoden	17
4.1 Nematoden toxiciteits test	17
4.2 In-vitro nematoden repellence test	19
4.3 Nematoden-afweer door grasproduct bij planten in grond (soilbox)	21
4.4 Nematodenbescherming door grasproduct in tomatenteelt	23
5. Stabiliteit van grasvezelpreparaten	25
5.1 Bepaling van stabiliteit van producten van verschillende baktemperatuur	25
6. Algemene conclusies en aanbevelingen	29

Samenvatting

De Nederlandse tuinbouw verbruikt jaarlijks 3.4 miljoen m³ veen als substraat voor de teelt van bloemen en planten. Hiervoor wordt elders in Europa hoogveen-natuur afgegraven. Maatschappelijk verzet tegen veenwinning groeit m.n. in Engeland. De Engelse overheid heeft met het bedrijfsleven een convenant afgesloten om in 2010 90% van het veen te vervangen. Dit dwingt Nederlandse tuinders om te zien naar alternatieven. Plant Research International ontwikkelt een alternatief voor veen op basis van natuurgras en riet middels torrefactie en microbiële rijping, al dan niet in combinatie met spoelen van het getorreficeerde product.

Torrefactie is een bakproces dat biomassa beschermt tegen een ongewenste te snelle microbiële afbraak. Microbiële rijping en spoelen zijn nodig om ongewenste stoffen die zich vormen tijdens het bakproces te verwijderen. Spoelen levert een spoelvloeistof op met kiemremmende en nematicide (aaltjes-dodende) eigenschappen. Toepassing van de spoelvloeistof, of van de totale getorreficeerde biomassa, ter onderdrukking van aaltjes lijkt vooral interessant omdat er vanuit de biologische tuinbouw vraag is naar gewasbeschermingsmiddelen van natuurlijke oorsprong. De mogelijkheden voor toepassing als nematicide vormen het onderwerp van dit rapport.

Voor de beoordeling van een dergelijke toepassing zijn experimenten uitgevoerd met onbehandeld en getorreficeerd natuurgras en riet. Monsters van gras en riet werden op lab-schaal getorreficeerd bij temperaturen van resp. 180, 200, 220, 240 en 260 °C gedurende 1 tot 3 uur. Deze monsters en extracten daarvan zijn beoordeeld op fytotoxiciteit, nematotoxiciteit en microbiële stabiliteit.

De fytotoxiciteit is *in vitro* beoordeeld middels kiemprouwen met sla en tuinkers en in grond bij opgroeiende planten van tomaat en chrysant. De nematotoxiciteit is beoordeeld *in vitro* bij twee plantparasitaire aaltjes (*Meloidogyne chitwoodi* en *Pratylenchus penetrans*). Daarbij is onderscheid gemaakt tussen een remmende, c.q. dodende werking en effecten als repellence. Effecten zijn getoetst in grond met tomaat als waardplant en *Meloidogyne incognita* en *M. hapla* als belagers.

De microbiële stabiliteit is onderzocht in *in vitro* incubaties met een normale bodemmicroflora en een incubatieduur van 6 weken.

Getorreficeerd gras, en in veel mindere mate riet, dat is gebakken bij een temperatuur tussen 180 en 220 °C bevat stoffen die toxisch kunnen zijn voor planten en nematoden. De gevoeligheid van zaailingen, grotere planten en nematoden verschilt (zie Tabel). Deze grasproducten bevatten tevens stoffen die repellent zijn voor aaltjes.

Tabel. Overzicht van effecten van getorreficeerd gras (180 °C) in oplopende doseringen bij verschillende organismen. Waterdoses zijn vertaald in grond doses onder de aanname van een bodemvochtigheid van 10% v/v. De dosering per ha is berekend uitgaande van een volveldse toepassing in een bouwvoor van 25 cm dik.

Doelorganisme	Latijnse naam	1 g/ltr water 0.1 g/ltr grond 0.25 ton/ha	10 g/ltr water 1 g/ltr grond 2.5 ton/ha	100 g/ltr water 10 g/ltr grond 25 ton/ha
Zaailing tuinkers	<i>Lepidum sativum</i>	Geen effect	Geen effect	Enige remming
Zaailingen sla	<i>Lactuca sativa</i>	Onbekend	Enige remming	Sterke remming
Plant chrysant	<i>Chrysanthemum</i>	Groeiremming	Groeiremming	Groeiremming
Plant tomaat	<i>Lycopersicon sp</i>	Geen effect	Geen effect	onbekend
Wortellesieaaltje	<i>Pratylenchus sp</i>	Geen effect	Geen effect	onbekend
Wortelknobbelaaltje	<i>Meloidogyne sp</i>	Repellent	Toxisch/statisch Repellent	Toxisch/statisch

Gewassen blijken in zeer verschillende mate gevoelig voor kiemremming door extracten van getorreficeerd gras. Sla blijkt veel gevoeliger dan tuinkers, chrysant gevoeliger dan tomaat. De voor de plantenteelt acceptabele dosis waarbij minder dan 10% fytotoxiciteit optreedt ligt vermoedelijk in de orde van 0.01 g getorreficeerd product/lt grond; dat is een factor 100 x lager dan de effectieve doses voor remming van aaltjesactiviteit. De planten hebben dus al last van de stoffen bij een veel lagere dosis dan nodig voor remming (mogelijk doding) van aaltjes. Voor het doden van aaltjes blijft alleen de optie over van een preplant behandeling met een wachttijd. Dit moet nader onderzocht worden. Repellence van aaltjes treedt wel op bij lage (niet fytotoxische) doses. Echter, ook hier zijn er grote verschillen tussen organismen: *in vitro* bleek *Meloidogyne chitwoodi* veel gevoeliger voor de extracten van getorreficeerde grasproducten dan *Pratylenchus penetrans*. Daarom lijkt de toepasbaarheid als pre-plant aaltjesdoder en/of post-plant aaltjesrepellent met name tegen *Meloidogyne* bij tomaat perspectief te hebben.

Om uit gras een stabiel substraat te maken zijn baktemperaturen nodig van minimaal 240 °C. Bij deze temperaturen zijn de toxische effecten (veel) geringer dan bij lagere temperaturen. De procescondities nodig voor het maken van een werkzaam preparaat tegen aaltjes zijn dus anders dan die voor het maken van een stabiel substraat voor de tuinbouw.

1. Inleiding en achtergrond

De Nederlandse tuinbouw speelt een hoofdrol in de mondiale productie van snijbloemen en potplanten. Maar deze hoofdrol heeft ook een keerzijde: de sector verbruikt jaarlijks 3.4 miljoen m³ veen als substraat voor de teelt van bloemen en planten. Hiervoor wordt elders in Europa hoogveen-natuur afgegraven: jaarlijks een laag van 1 m dik over een oppervlak van 700 voetbalvelden. De natuur doet hier 1000 jaar over om deze hoeveelheid weer opnieuw aan te maken. Maatschappelijk verzet tegen veenwinning groeit m.n. in Engeland. De Engelse overheid heeft met het bedrijfsleven een convenant afgesloten om in 2010 90% van het veen te vervangen. Engelse supermarkten moeten dus de verkoop van planten op veen staken. Dit dwingt Nederlandse tuinders om te zien naar alternatieven. Plant Research International ontwikkelt een alternatief voor veen op basis van natuurgras en riet middels torrefactie en microbiële rijping, al dan niet in combinatie met spoelen van het getorreficeerde product.

Torrefactie is een proces waarbij voorgedroogde biomassa verhit wordt tot temperaturen tussen 200 en 300 °C in een inerte (zuurstofloze of zuurstofarme) atmosfeer, zonder toevoeging van chemicaliën. Torrefactie gaat gepaard met afbraak van met name hemicellulose en met schijnbare vorming van lignine en leidt daardoor tot een duurzamer product. Dat wil zeggen dat de microbiële afbreekbaarheid onder invloed van torrefactie sterk afneemt. Het product heeft dus geen last meer van rotting en ongewenst volumeverlies tijdens het gebruik. Microbiële rijping is nodig om de geurstoffen en kiemremmende stoffen die tijdens torrefactie gevormd worden, af te breken. Welke stoffen dit zijn is slechts ten dele bekend uit de internationale literatuur.

Een alternatief of aanvulling op microbiële rijping is het spoelen van het getorreficeerde product. Dat levert een spoelvloeistof op met kiemremmende en nematicide eigenschappen. Toepassing hiervan, of van het totale getorreficeerde product, ter onderdrukking van nematoden (aaltjes) lijkt vooral interessant omdat er vanuit de biologische tuinbouw vraag is naar gewasbeschermingsmiddelen van natuurlijke oorsprong. De mogelijkheden voor toepassing als nematicide vormen het specifieke onderwerp van dit rapport.

Het onderzoek naar nieuwe substraten voor de tuinbouw wordt uitgevoerd in verschillende parallelle projecten. In een Biopartner-project 'Duurzame substraten voor de tuinbouw' gefinancierd door NWO hebben we de technische en commerciële haalbaarheid van het totale productieproces onderzocht. De beide deelprocessen, torrefactie en microbiële rijping, zijn daartoe eerst onderzocht op laboratoriumschaal. Hieruit is een protocol ontwikkeld en dit is vervolgens getoetst in proeven met een pilot-installatie op de schaal van enkele m³ eindproduct.

Voor de pilot-proeven werd een partij natuurgras (hooi) en een partij droog riet gekocht. Uitvoering van de proeven bleek op een aantal technische problemen te stuiten, in hoofdzaak verband houdend met het transport naar, in en uit de oven. Dit transport gebeurde mechanisch. Hooi liet zich in het geheel niet verwerken doordat verstopping optrad in de toevoer en uitvoer en het gras zich ophoopte in de oventrommel. Hierdoor konden van natuurgras geen batches geproduceerd worden. Bij de verwerking van riet traden soortgelijke problemen op. Desalniettemin lukte het om twee batches getorreficeerd riet aan te maken.

De twee batches getorreficeerd riet, aangevuld met onbehandeld riet en getorreficeerde houtsnippers zijn vervolgens gemalen m.b.v. een hamermolen. Deze vier gemalen producten zijn daarna gebruikt om experimentele substraten aan te maken. De materialen zijn daartoe in verschillende verhouding (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, cocopeat: product) gemengd met cocopeat. Cocopeat is gekozen om drie redenen: het is een niet-veen product, het heeft aantrekkelijke vocht karakteristieken complementair aan getorreficeerde biomassa, en verkennende proeven hadden laten zien dat bij getorreficeerd riet enting met cocopeat tot een snelle verwijdering van geurstoffen en kiemremmende stoffen leidt. In totaal zijn 16 experimentele substraten aangemaakt en gedurende 6 weken gerijpt. Metingen van het temperatuurverloop van de mengsels gaven een eerste indicatie dat torrefactie inderdaad het proces van groei onderdrukt.

De 16 experimentele substraten zijn door het Plantaardig Praktijk Onderzoek (PPO) van Wageningen UR middels standaardtoetsen beoordeeld op fysische, chemische en biologische karakteristieken. Op basis van deze resultaten

werd besloten het riet getorreficeerd bij 250 °C in een verhouding van 1:1 (50 vol% riet, 50 vol% cocopeat) en 1:4 (80 vol% riet, 20 vol% cocopeat) te testen in een groeiproef met drie gewassen (Primula, Chinese kool, en sla). Hierbij zijn als referentie meegenomen: onbehandeld riet in 1:1 verhouding met cocopeat, pure cocopeat en standaard potgrond.

De beoordeling door het PPO is duidelijk t.a.v. zowel onbehandeld als getorreficeerd riet:

1. Onbehandeld is zelfs een relatief duurzaam materiaal als dode rietstengels niet geschikt als substraat voor de tuinbouw. De microbiële afbreekbaarheid is eenvoudigweg te hoog waardoor competitie ontstaat tussen de behoefte aan voedingsstoffen (stikstof en fosfor) van de bodemmicroflora en het gewas. Het gewas legt het daarbij af tegen de micro-organismen waardoor nutriëntentekorten ontstaan en mogelijk toxiciteit ten gevolge van afbraak van organisch materiaal.
2. Getorreficeerd riet (in een mengsel van 80 vol% riet) blijkt wel geschikt als substraat door een duurzaamheid die vergelijkbaar blijkt met veen en zelfs wat hoger dan die van cocopeat. Van de drie testgewassen groeiden er twee even goed op getorreficeerd riet als op cocopeat en standaard potgrond, en één gewas groeide slechter op riet dan op cocopeat, maar beter dan op standaard potgrond. Mogelijk is er toch nog een lichte toxiciteit in het getorreficeerde riet aanwezig waarop gevoelige gewassen reageren.

De technische kengetallen die verzameld zijn tijdens de pilotproeven zijn gebruikt voor gedetailleerde kostprijs-berekeningen van het nieuwe substraat. Deze zijn uitgevoerd voor een installatie met een verwerkingscapaciteit van 50.000 ton ds per jaar onder vier verschillende scenario's:

1. seizoensmatige aanvoer van gras met 50% ds,
2. seizoensmatige aanvoer van gras met 75% ds,
3. continue aanvoer van hooi met 85% ds,
4. continue aanvoer van riet met 85% ds.

In scenario 1 en 2 is opslag van gras in silo-bags voorzien, in scenario 3 en 4 wordt de grondstof decentraal opgeslagen en beschikt de fabriek alleen over een buffer van 1 maand.

De kostprijs wordt bepaald door de prijs van de grondstof en door de verwerkingskosten. Gras afkomstig uit natuur of wegbermen heeft veelal een negatieve prijs, terwijl hooi afhankelijk van kwaliteit en toepassing een positieve waarde heeft. De rentabiliteit zal dus afhangen van het poorttarief: de prijs die de verwerker betaalt aan de leverancier van biomassa bij aflevering aan de fabriek. Hoe hoog dit poorttarief maximaal mag zijn, is weer afhankelijk van de waarde van het eindproduct. Aangezien het getorreficeerde biomassa ook als brandstof gebruikt kan worden, is berekend bij welk poorttarief verwerking van gras of riet tot brandstofpoeder dan wel substraat aantrekkelijk wordt.

Voor de brandstoftoepassing is daarbij een waarde gehanteerd van € 6 per GJ. Deze waarde wordt door ECN gehanteerd in studies naar de toepassing van getorreficeerde biomassa als groene-energiedrager.

Voor de toepassing als substraat is de waarde gevarieerd tussen € 15 per m³ en € 35 per m³. Dit laatste getal zien we als een bovengrens; het veronderstelt dat het eindproduct vergelijkbaar is met coco-peat en bovendien rechtstreeks geleverd wordt aan telers. De uitkomsten van deze berekeningen staan hieronder samengevat.

Maximaal poorttarief in Euro per ton ds voor een rendabele verwerking van verschillende grondstoffen tot een brandstofpoeder dan wel een substraat voor de tuinbouw.

Eindproduct		Grondstof			
		natuurgras	natuurgras	natuurhooi	riet
aard	waarde	50% ds	75% ds	85% ds	85% ds
energie	€6/GJ	-3	17	44	44
substraat	€15/GJ	-32	-20	5	14
substraat	€25/GJ	-3	17	43	52
substraat	€35/GJ	25	53	81	90

Voor natuurgras met een ds-gehalte van 50% is een rendabele verwerking tot substraat mogelijk bij een poorttarief van € -32 per ton ds en een verkoopwaarde af fabriek van € 15 per m³ substraat. Echter, een fabriek die dezelfde grondstof verwerkt tot brandstofpoeder kan een poorttarief bieden van € -3 per ton ds. Verwerking van het getorreficeerde gras tot een substraat is dus in dit scenario niet concurrerend met rechtstreekse toepassing van het tussenproduct als brandstofpoeder. Een concurrerende verwerking is pas mogelijk bij een waarde van het substraat van meer dan € 25 per m³.

Bovenstaande tabel laat zien dat alleen indien de waarde van het substraat gelijk of hoger is dan € 25 per m³ de verwerking kan concurreren met die tot brandstofpoeder. Dit is evenveel als momenteel in Rotterdam haven betaald wordt voor cocopeat (de belangrijkste veenvervanger op dit moment), maar méér dan voor veen betaald wordt. Een prijs van € 25 per m³ voor ons product is op dit moment niet haalbaar, maar het perspectief kan veranderen. Voorwaarden voor een commercieel succesvolle introductie van het nieuwe substraat zijn: een constante hoge kwaliteit, brede inzetbaarheid, en introductie van het product in niche-markten (biologische tuinders) bij voorkeur rechtstreeks aan eindgebruikers om de kosten van de tussenhandel te elimineren. Er is dus behoefte aan een traject van verdere productontwikkeling en marktintroductie, parallel aan de perfectionering van de techniek van torrefactie voor lichte materialen als gras en riet.

2. Materialen en torrefactie

Voor de experimenten is gebruik gemaakt van een eerste snede natuurgras en dood riet, beide afkomstig van het terrein de Veenkampen gelegen op venige klei in het Binnenveld nabij Wageningen.

Het natuurgras werd op 20 augustus 2003 geoogst en was afkomstig van een herintroductie-experiment. Het betreffende perceel werd uit productie genomen in 1995, 10 cm geplagd, daarna niet meer bemest en jaarlijks gemaaid waarbij het maaisel wordt afgevoerd (opbrengst circa 4 ton ds per ha per jaar bij 1 snede). De soortenrijke vegetatie (> 30 soorten) wordt gedomineerd door biezenknoppen, verder komen soorten als veldrus, blauwe knoop, fioringras, moerasrolklaver veel voor en meerdere zeggesoorten.

Het riet werd op 12 mei 2004 aan een slootkant van hetzelfde perceel geoogst en bestond uitsluitend uit de dode stengels.

Beide materialen werden gehakseld, gedroogd bij 105 °C en gemalen met een hamermolen met zeefdiameter 1mm. Een monster van beide objecten is geanalyseerd op droge stof gehalte, en de gehalten aan totaal N, P, K, Na, Mg, en Ca. De resultaten hiervan staan vermeld in Tabel 1.

Tabel 1. Samenstelling van natuurgras en riet.

	N	P	K	Na	Ca	Mg	ds
	g per kg ds						g per kg vers
gras	12.17	0.99	6.33	3.47	7.56	2.48	375
riet	4.75	0.28	0.74	0.18	0.76	0.24	850

Voor het torreficeren werd gebruik gemaakt van een moffeloven en aluminium bakjes met deksel met een inhoud van 200 ml. Bakjes werden tot de rand gevuld met gemiddeld 40 g droog gemalen gras of riet. Deze werden voorzien van deksel met vier tegelijk in het midden van een voorverwarmde oven geplaatst en verhit gedurende 1 of 3 uur bij temperaturen van resp. 180, 200, 220, 240, 260 °C. De doosjes werden op hun kop gezet om zuurstofloosheid tijdens het bakken te bevorderen. Na afloop van het bakken werden de doosjes uit de oven genomen en ongeopend afgekoeld tot omgevingstemperatuur.

Door weging voorafgaand en na afloop van het bakken werd het verlies aan drogestof vastgesteld. Het gewichtsverlies is een goede maat voor de intensiteit van torrefactie. Voor gras liep het gewichtsverlies bij verhitting gedurende 3 uur bij temperaturen van 180, 200, 220, 240, 260 °C op van 2.1, 8.2, 14.0, 24.1 tot 32.9 % van de drogestof, voor riet was dit resp. 0.2, 1.1, 9.4, 16.5 en 20.4%. Het geringere verlies bij riet duidt op een kleinere fractie hitte-labele bestanddelen. Deze zijn vermoedelijk gedurende de winterperiode al uitgeloozd of afgebroken.

De onbehandelde en getorreficeerde materialen zijn gebruikt om waterige extracten van te maken door uitschudden in demiwater gedurende 2 uur. Daarbij werd standaard een verhouding van 4 g ds gras of riet per 100 ml water toegepast. Van de extracten werd de pH en EC gemeten.

Met de aldus verkregen extracten zijn experimenten uitgevoerd om de toxiciteit voor kiemende zaden (fytotoxiciteit) en voor nematoden (nematotoxiciteit) vast te stellen. Deze experimenten moeten uitwijzen of extracten of het complete product nematoden kunnen onderdrukken zonder de plantengroei ernstig te remmen. Resultaten van deze proeven worden in de volgende hoofdstukken besproken.

3. Fytotoxiciteit van grasproducten

3.1 Pilot-experiment fytotoxiciteit bij kiemende zaden

Doel

Vaststellen van kiemremmende effecten van grasextracten bij twee gewassen en bepalen van de beste test-soort en beoordelingsmomenten. Een informatieve snelle test zou gebruikt kunnen worden bij de optimalisering van het productieproces van graspreparaten voor verschillende toepassingen.

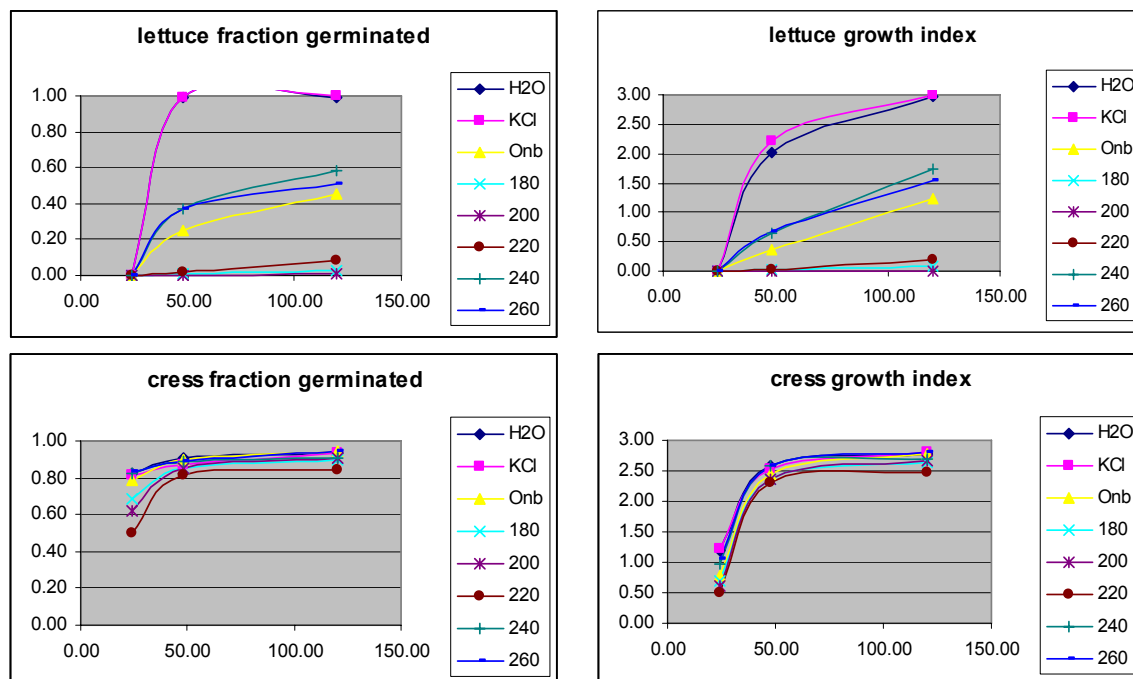
Methode

Het kiemingspercentage en de (relatieve) kiemingssnelheid en initiële wortelgroei van sla (*Lactuca sativa* cv Erica) en tuinkers (*Lepidium sativum*) onder invloed van verschillende grasextracten werd bepaald op filterpapier in petri-schalen. Extracten werden gemaakt van de volgende materialen: gras onbehandeld en gras gebakken gedurende 3 uur bij 180, 200, 220, 240 en 260 °C. Alle extracten werden alleen in de concentratie 1/25 droog gras op water toegepast. Als controles fungeerden demi-water en KCl oplossing van vergelijkbare zoutsterkte als de grasextracten. Observaties werden verricht na 1, 2 en 5 dagen. Daarbij werd tevens de volgende wortelgroei-index gegeven: 0=geen kiemworteltje zichtbaar, 1=1-2 mm, 2=3-8mm, 3=>9mm.

Resultaten

In onderstaande tabellen en grafieken zijn de kiemingspercentages en wortelgroei-indexen van sla (Lettuce) en tuinkers (Cress) weergegeven zoals waargenomen na 1, 2 en 5 dagen vanaf de zaai op verschillende extracten van behandeld gras. Remming met 92 tot 100 % van de kieming van sla treedt op bij extracten van gras gebakken bij 180 tot 220 °C. De verschillen tussen de extracten zijn het grootst na 2 en 5 dagen. Na 5 dagen zijn de zaden ofwel gekiemd of geremd en nauwelijks in de tussenfase. Na 5 dagen is er nog wel enige kieming van sla in the extracten met lage initiële kieming, maar 100 % wordt niet bereikt na 2 weken. Uiteindelijk raakten de zaden overgroeid door schimmels en droogde het filtreerpapier uit.

Bij tuinkers is er veel minder kiemremming; aanvankelijk tot 50%, maar dat herstelt zich na 5 dagen tot nog hooguit 15 % remming. De wortelgroei-indexen (gemiddeld over alle zaden) geven vrijwel hetzelfde beeld als de kiemingspercentages.



Figuur 1. Kiemingspercentages en wortelgroei-indexen van sla (Lettuce) en tuinkers (Cress) zoals waargenomen na 1, 2 en 5 dagen vanaf de zaai op verschillende extracten van behandeld en onbehandeld Gras. De codes voor de grasextracten geven de baktemperatuur aan.

Tabel 2. Kiemingspercentages en wortelgroei-indexen van sla (*Lettuce*) en tuinkers (*Cress*) zoals waargenomen na 1, 2 en 5 dagen vanaf de zaai op verschillende extracten van behandeld en onbehandeld Gras. De codes voor de grasextracten geven de baktemperatuur en bakduur aan.

Treatment	% germination						Mean root index (0-3)					
	Lettuce (<i>Lactuca sativa</i> cv . Erica) ¹						Lettuce (<i>Lactuca sativa</i> cv . Erica) ²					
Day nr.	1		2		5		1		2		5	
Tap water	0	ns	99.5	a	99.5	a	0	ns	2.02	ab	2.99	a
demi-KCl	0		99.5	a	100.	a	0		2.22	a	3.00	a
untrd. grass	0		25.0	c	45.2	d	0		0.36	abc	1.24	ab
180-3 hr	0		1.0	de	2.9	f	0		0.01	c	0.08	b
200-3 hr	0		0.0	e	0.5	g	0		0.00	c	0.00	b
220-3 hr	0		1.4	d	8.2	e	0		0.01	bc	0.18	ab
240-3 hr	0		37.5	b	58.2	b	0		0.65	abc	1.73	ab
260-3 hr	0		37.5	b	51.0	c	0		0.68	abc	1.53	ab

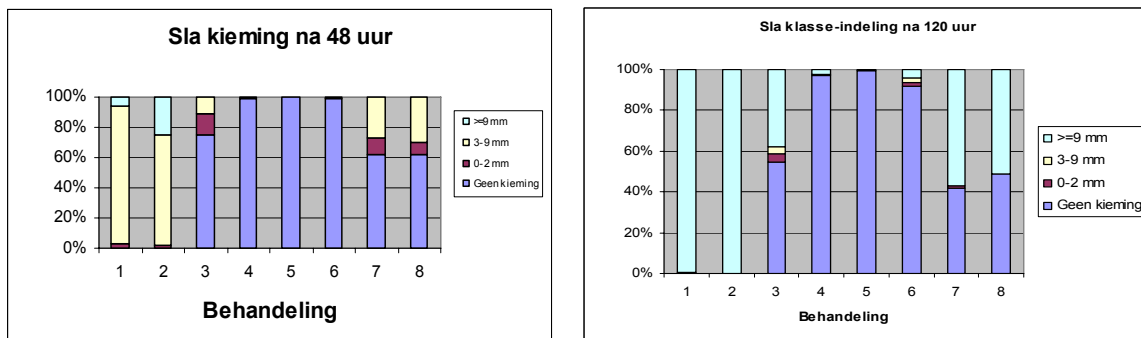
Treatment	% germination						Mean root index (0-3)					
	Cress (<i>Lepidum sativum</i>) ¹						Cress (<i>Lepidum sativum</i>) ²					
Day nr.	1		2		5		1		2		5	
Tap water	82	a	91	a	93	abc	1.21	a	2.58	ns	2.77	ns
demi-KCl	82	a	87	b	94	ab	1.24	ab	2.53		2.79	
untrd. grass	78	b	90	a	95	a	0.78	abc	2.44		2.76	
180-3 hr	68	c	86	bc	89	c	0.68	abc	2.37		2.64	
200-3 hr	62	d	85	bc	90	c	0.62	bc	2.35		2.66	
220-3 hr	50	e	82	c	85	d	0.50	c	2.31		2.47	
240-3 hr	82	a	89	ab	91	bc	0.97	abc	2.58		2.71	
260-3 hr	83	a	89	ab	94	a	1.04	abc	2.58		2.81	

¹ comparison of means by binomial test (0.05) on total number of seeds (208 per treatment)

² comparison of means by Kruskal-Wallis test (0.05) because of non-homogeneity of variance

Conclusies/Discussie

Grasextracten van de lagere baktemperaturen 180, 200 en 220 °C zijn het meest remmend voor de kieming van sla, terwijl er nauwelijks remmende effecten van de extracten zijn waargenomen bij tuinkers. Sla is de beste soort voor de zaailing toets omdat ze gevoeliger is en meer onderscheidend dan tuinkers. Verschillen tussen extracten zijn het duidelijkst tussen 48 en 120 uur. Na 120 uur (5 dagen) vindt er nog enige aanvullende kieming plaats. Dat wil zeggen dat het effect voor een klein deel van de geremde zaden niet permanent is. De snelle test met sla is geschikt voor het monitoren van het productieproces van graspreparaten.



Figuur 2. Verdeling van de zaailingen van sla over de wortelgroei-klassen op drie tijdstippen na zaai onder invloed van verschillende extracten. (1= kraanwater, 2= demi-KCl, 3= onbeh.gras, 4= 180°, 5= 200°, 6= 220°, 7= 240° en 8= 260 °C)

3.2 Fytotoxiciteit van gras- en rietextracten met en zonder pH-correctie

Doel

Het bepalen van verschillen in kiemremming door extracten van behandeld gras en behandeld (uitgeleegd) riet (Phragmites) en bepalen van effecten hierop van pH-correctie.

Methoden

Kiemtesten werden uitgevoerd als onder 3.1. Extracten werden gemaakt in de concentratie van 1/25 door uitschudden in demiwater gedurende 2 uur. De pH werd gecorrigeerd naar 7.5 in porties van de extracten door toevoeging van 0.1 N NaOH oplossing. De geleidbaarheid (EC) en pH werden gemeten in de pH-corrigeerde en ongecorrigeerde extracten.

Resultaten

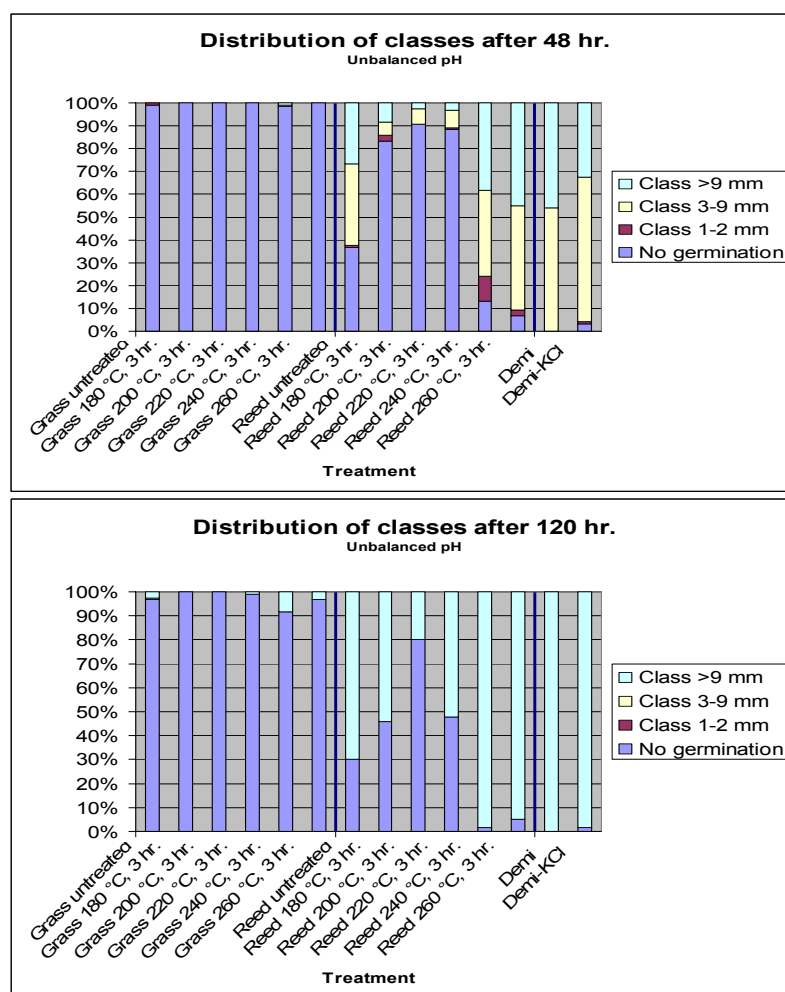
Hogere baktemperaturen leidden tot hogere pH in extract van gras, maar niet van riet (Tabel 3). Hogere EC werd gevonden na hogere baktemperaturen bij beide materialen en was onafhankelijk van de pH. De EC van grasextracten was veel hoger dan die van extracten van uitgeleegd riet.

Kieming van slazaad werd in alle grasextracten (zelfs van onbehandeld gras) sterk geremd, wat niet overeenstemt met het vorige experiment. Tussen extracten van riet werden verschillen tussen baktemperaturen gevonden (Fig. 3). Sterke remming trad op na baktemperaturen tussen 180 en 220 °C (vergelijkbaar met grasextracten in experiment 1.1.) Vooral de 200 °C baktemperatuur gaf een remmend extract. Correctie van de pH naar 7.5 gaf iets meer inhibitie in rietextracten (Fig. 4).

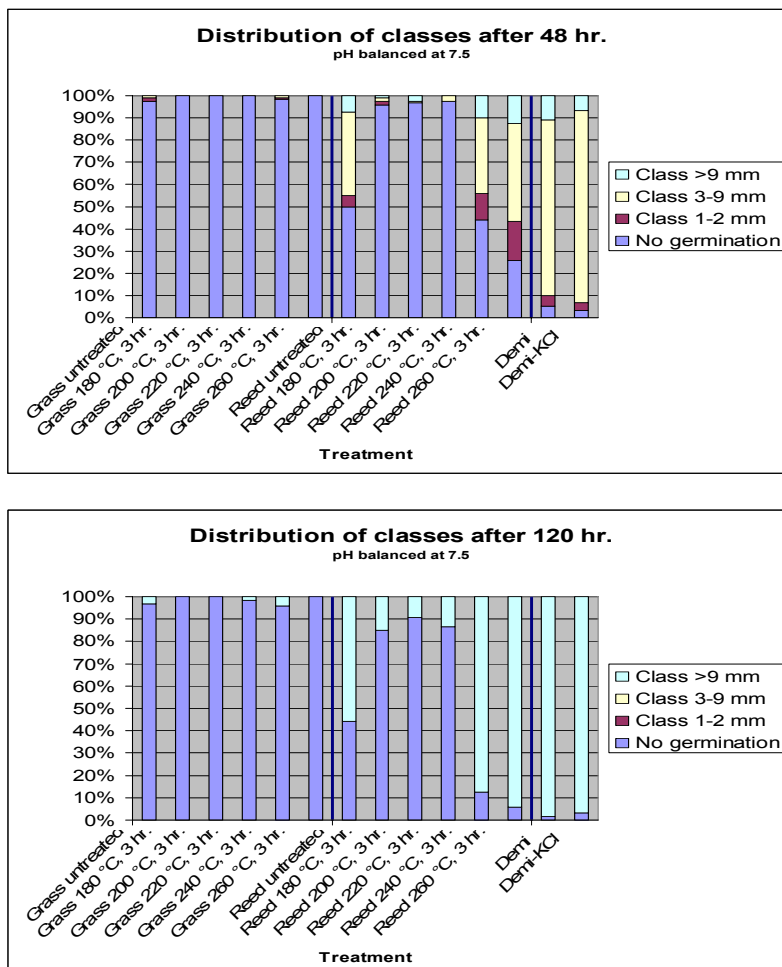
Na 120 uur waren er geen plantjes de tussenstadia van kieming, hetgeen aanduidt dat het proces niet vertraagd doorgaat in de geremde objecten.

Tabel 3. pH en EC waarden van extracten met en zonder pH-correctie naar 7.5.

Behandeling	pH	EC	Behandeling	pH	EC
Gras onb.	5.61	1704	Gras onb. 7.5	7.48	1816
Gras 180	5.29	1734	Gras 180 7.5	7.50	1861
Gras 200	5.49	1805	Gras 200 7.5	7.50	1833
Gras 220	5.91	1734	Gras 220 7.5	7.53	1779
Gras 240	6.79	1358	Gras 240 7.5	7.53	1422
Gras 260	7.21	1165	Gras 260 7.5	7.49	1155
Riet onb.	5.38	202	Riet onb. 7.5	7.52	246
Riet 180	5.01	217	Riet 180 7.5	7.48	268
Riet 200	4.81	239	Riet 200 7.5	7.51	302
Riet 220	4.89	240	Riet 220 7.5	7.48	315
Riet 240	5.21	130	Riet 240 7.5	7.51	158
Riet 260	5.54	88	Riet 260 7.5	7.48	151
Demi	6.65	10	Demi 7.5	7.60	110
Demi-KCl	6.65	1757	Demi-KCl 7.5	7.54	1753



Figuur 3. Kieming van sla in ongecorrigeerde extracten van behandeld gras en riet na 48 en 120 uur. Klassen geven de grootte van de kiemplantjes weer.



Figuur 4. Kieming van sla in pH-gecorrigeerde extracten van behandeld gras en riet na 48 en 120 uur. Klassen geven de grootte van de kiemplantjes weer.

Discussie en conclusies

Extracten van behandeld (en onbehandeld) gras in de concentratie 1/25 geven een sterkere kiemremming dan extracten van behandeld uitgeloozd riet. Gras bevat blijkbaar hogere concentraties van fytotoxische moleculen dan uitgeloozd riet, de hogere EC wijst ook op hogere concentraties van vrije ionen, waaronder organische zuren en andere verbindingen. Door het bakken van riet komen nog wel wat extra remmende stoffen vrij. Verhogen van pH naar 7.5 bevorderde de kiemremming van rietextracten, hetgeen suggereert dat de oorspronkelijke zure vormen van de gebakken moleculen in doorsnee minder toxisch of meer beschermend zijn. De kiemremming lijkt irreversibel, omdat er na 120 uur geen tussenstadia zijn waargenomen.

3.3 Fytotoxiciteitsproeven bij tomaat en chrysant in grond

Doel

Bepalen van mogelijke groeiremming bij toediening van grasproduct bij planten in grond.

Methoden

Fytotoxiciteitsproeven met het product GT180-3 (180°C gedurende 3 uur) zijn uitgevoerd met voorgekweekte tomaat en met chrysant met perskruit, in kleine potjes met 200 ml zand met 5% potgrond. De GT behandeling werd gedaan in twee doses (1 en 0.1 gram per liter grond). De plantjes (5 per behandeling/dosis) waren steeds voorgekweekt tot ca 8-10 resp, 10-12 cm hoogte. De incubatie in behandelde grond in de kas (18-22 °C) was 3 resp. 4 weken. Versgewichten van spruit en wortels zijn bepaald. (wortelgegevens van tomaat waren door een fout niet betrouwbaar)

Resultaten

De grasbehandelingen gaven voor alle variabelen een lichte reductie te zien. Deze was echter alleen significant voor de spruitgroei van Chrysant na 4 weken (-14%).

Tabel 4. Effecten van getorreficeerd gras op groei van tomaat en chrysant.

Versgewichten (g)	Tomaat		Chrysant		Chrysant	
	Spruit	%	Spruit	%	Totaal	%
Blanco onbehandeld	5.54	100	8.58	100	11.46	100
GT180-3 (0.1 g/l grond)	5.08	92 ns	7.41	86 *	10.18	89 ns
GT180-3 (1 g /l grond)	5.05	91 ns	7.42	86 *	10.20	89 ns

* = significant verschillend van blanco; ns = geen verschil met blanco

Discussie en Conclusies

De conclusie is dat GT180-3 bij 0.1 g/l grond licht fytotoxisch is bij chrysant m.b.t. de spruitgroei. Eenzelfde trend kon bij tomaat niet significant worden aangetoond.

Met de gebruikte doses vanaf 0.1 g/l grond (ofwel ca 1 g/ liter bodemwater) moet voorzichtig worden omgesprongen. Mogelijk is een wachttijd van enkele dagen waarin de toxische stoffen worden afgebroken afdoende, mits de juiste microorganismen aanwezig zijn.

De voor de plantenteelt acceptabele GT180-dosis waarbij minder dan 10% fytotox optreedt ligt vermoedelijk een factor 10 lager dan hier gebruikt, ofwel rond de 0.01 g/l grond (ca. 0.1 g/l bodemwater). Dit is grofweg 100 x lager dan de effectieve doses voor remming van aaltjesactiviteit (zie hoofdstuk 4.1). De planten hebben dus al last van de stoffen bij een veel lagere dosis dan nodig voor remming (mogelijk doding) van aaltjes. Voor het doden van aaltjes blijft alleen de optie van een preplant behandeling met een wachttijd over. Dit zou nader onderzocht moeten worden. Repellence van aaltjes treedt wel op bij lage (niet fytotoxische) dosis (zie 4.2)



Figuur 5. Overzicht over de fytotoxiciteitsproef met tomaat.

4. Effecten van grasextracten op nematoden

4.1 Nematoden toxiciteits test

Doel

Bepaling van mogelijke nematotoxische of nematostatistische effecten van grasproducten op *Pratylenchus* en *Meloidogyne* aaltjes. Een informatieve snelle test zou gebruikt kunnen worden bij de optimalisering van het productieproces van graspreparaten voor verschillende toepassingen.

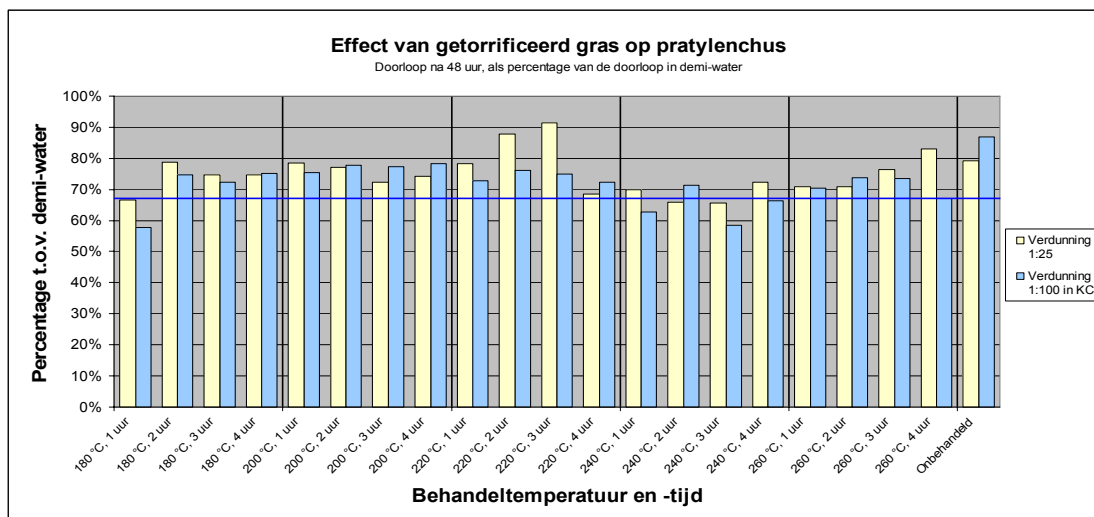
Methoden

Nematotoxische of nematostatistische effecten van grasproducten zijn onderzocht door bepaling van de migratie-activiteit van *Pratylenchus* en *Meloidogyne* aaltjes in grasextracten in vitro. Dit is gedaan met de zg. 'filtertoets'. De relatieve activiteit is afgeleid uit het aantal aaltjes dat in 24, resp. 48 uur door een filter weet te kruipen. Controles waren demi-water, demi+KCl (12mM), en onbehandeld gras. Verdunningen van extracten 1/25 en 1/100 werden getest. Met uitzondering van de demi-water controle is steeds vanuit 1/25 verdund met demi-KCL (12 mM) = EC van onbehandeld gras; alle behandelingen zijn nog iets verder aangelengd met 200/900 kraanwater via toevoeging van de aaltjessuspensie. Objecten zijn gecodeerd volgens baktemp-baktijd. Testsoorten waren *Pratylenchus penetrans* en *Meloidogyne chitwoodi* Ccm.

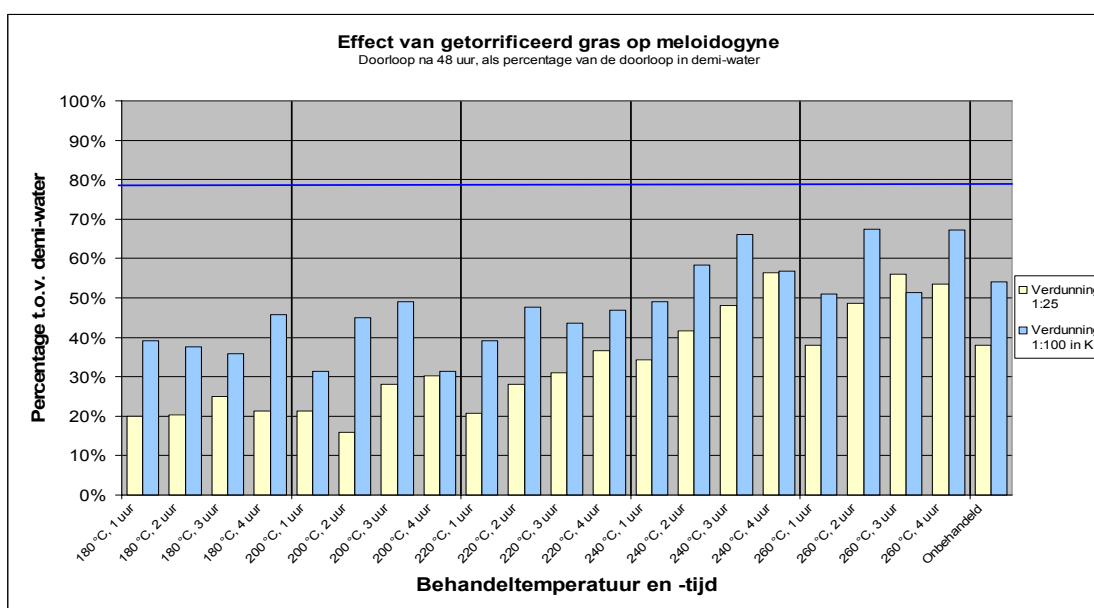
Resultaten

In onderstaande grafieken is de relatieve activiteit over 48 uur weergegeven als percentage van de watercontrole. *Pratylenchus penetrans* is ruim 30% geremd door de KCl oplossing en de grasextract- behandelingen wijken niet veel af van het niveau met KCl. Behandelingen - op 240°C na - lijken zelfs een zeer lichte stimulering van de migratie te geven. Verdunningen geven geen verschil.

Meloidogyne chitwoodi Ccm is ruim 20% geremd door de KCl oplossing, maar de behandelingen wijken duidelijk af van het niveau met KCl. Behandelingen op 180-220°C geven de sterkste reductie van migratieactiviteit (tot 60/80 =75%) en 240-260 de minste. Onbehandeld gras is intermediair. Langere baktijden verminderen i.h.a. de inhibitie van migratie iets vooral bij de hogere baktemperaturen. Verdunning met een factor 4 (1/100 ipv 1/25) geeft in het algemeen een vermindering van de inhibitie, maar ook in de 1/100 verdunning komen de meest effectieve behandelingen (180-220 °C) nog op ca 50% reductie t.o.v. de KCL referentie.



Figuur 6. Effect van grasextracten in verdunningen 1/25 (geel) en 1/100 (blauw) in KCl op de relatieve activiteit van *Pratylenchus penetrans*. De graspreparaten zijn gecodeerd volgens baktemperatuur en baktijd. De blauwe lijn op 67% geeft het activiteitsniveau in de KCl-controle weer.

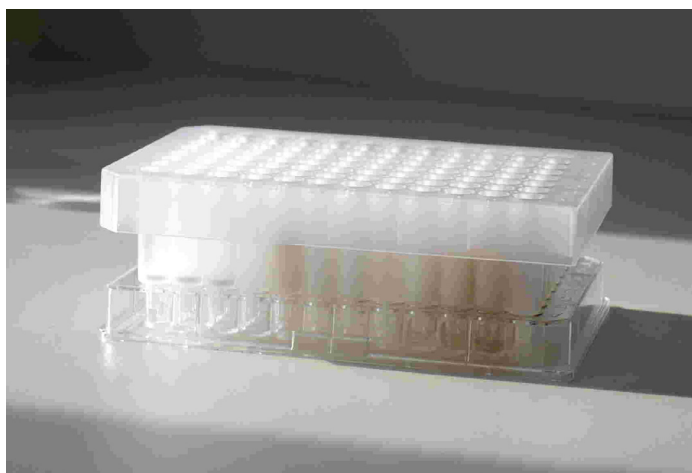


Figuur 7. Effect van grasextracten in verdunningen 1/25 (geel) en 1/100 (blauw) in KCl op de relatieve activiteit van *Meloidogyne chitwoodi*. De graspreparaten zijn gecodeerd volgens baktemperatuur en baktijd. De blauwe lijn op 78% geeft het activiteitsniveau in de KCl-controle weer.

Discussie en Conclusies

Meloidogyne chitwoodi is veel gevoeliger voor de extracten van de grasproducten dan *Pratylenchus penetrans*. Lagere baktemperaturen (180-220 °C) leveren voor *Meloidogyne* een giftiger extract dan de hogere (240-260 °C); Analooq geven kortere baktijden van rond 1 uur binnen een baktemperatuur meestal iets meer inhibitie van *Meloidogyne* dan de langere baktijden (3-4 uur). Bij de lagere baktemperaturen geeft een verdunning met een factor 4 een verhoging van de migratie met een factor 2. De ED50 van GT180 voor *M. chitwoodi* wordt geschat op ca

1:150 en de ED90 op ca 1:10. Uit de resultaten kan niet worden afgeleid in hoeverre de effecten lethaal of slechts remmend zijn. De snelle labtest met *Meloidogyne* is geschikt voor het monitoren van het productieproces van graspreparaten.



Figuur 8. Opstelling van de in-vitro nematoden activiteitstest.

4.2 In-vitro nematoden repellence test

Doel

Vaststellen van eventuele repellente (afstotende) of aantrekkende effecten van grasextracten voor plantparasitaire nematoden.

Methoden

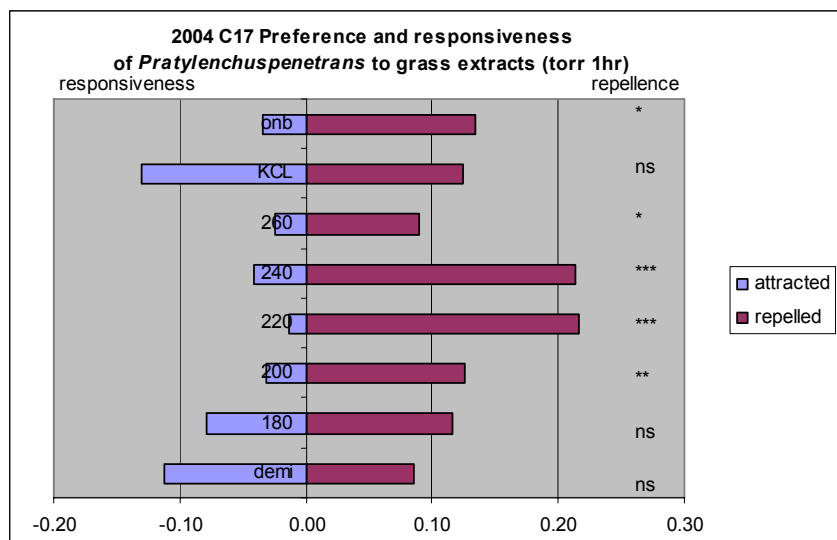
ca 50-100 Nematoden werden aangebracht midden op een uitgesneden agar-strook waarop aan een uiteinde 15 μ l van de testvloeistof en aan het andere uiteinde een zelfde hoeveelheid water (controle) was aangebracht. De strookjes werden geïncubeerd bij 20°C, gedurende 24 en 17 uur voor respectievelijk *Pratylenchus penetrans* en *Meloidogyne chitwoodi*. Er werden 3-12 herhalingen geanalyseerd om de reactie van voldoende aaltjes per behandeling te kunnen scoren (totaal ca 150-250 nematoden per behandeling).

De behandelingen waren: extracten van grasproducten gebakken voor 1 uur bij 5 verschillende temperaturen (180, 200, 220, 240, 260 °C). Als referentie werden meegenomen: onbehandeld gras (alleen voor *Pratylenchus*), demi water en demi-KCl (12 mM) = EC van onbehandeld gras).

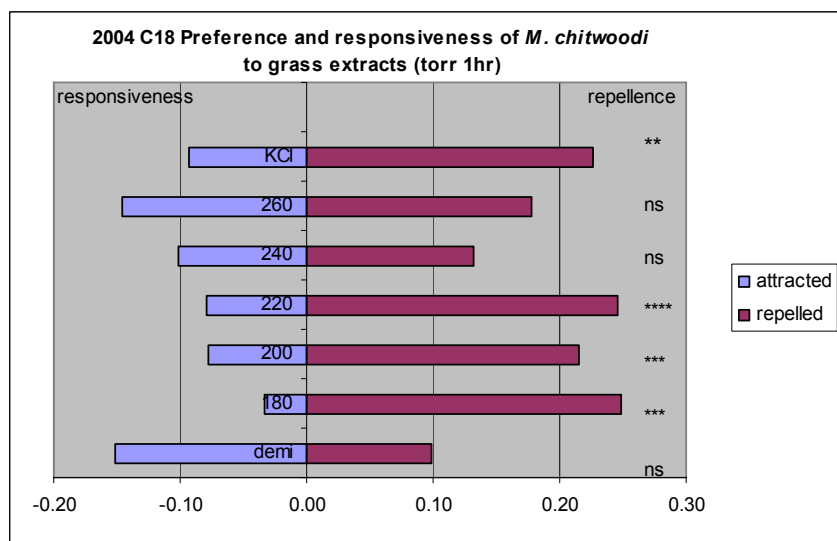
Statistiek: Per behandeling werd met een binomiale test bepaald of er verschil was met de gevonden verdeling in de demiwater vs. demiwater controle. De fractie actieve nematode (responsiveness) werd getest in een ANOVA met LSD ($p=0.05$). Onbehandeld gras werd niet getest met *Meloidogyne*, en een herhaling van de demi-demi controle werd weggelaten wegens afwijkende respons.

Resultaten

Bij *Meloidogyne* werd de sterkste repellence gevonden in de extracten van 180-220 °C. Bij *Pratylenchus* waren 220 and 240 °C het meest repellent. KCl (12mM) was repellent voor *Meloidogyne*, maar niet voor *Pratylenchus*. De *responsiveness* (= % van toegevoegde aaltjes dat zich buiten de inoculatie-zone begeeft) lijkt nauwelijks te worden beïnvloed door het type extract. Alleen het extract van 260 °C had een relatief lage *responsiveness* bij *Pratylenchus*, hetgeen suggereert dat er mogelijk nematostatische of nematotoxische stoffen aanwezig zijn.



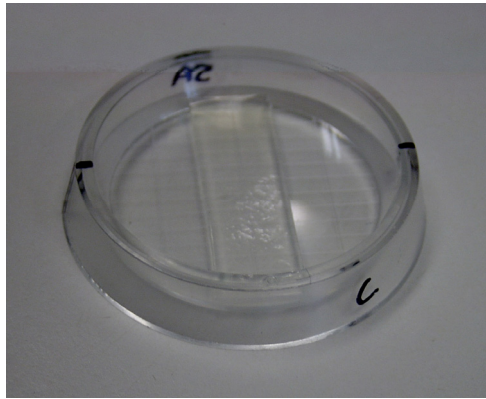
Figuur 9. Respons en oriëntatie van *Pratylenchus penetrans* ten opzichte van verschillende grasextracten *in vitro*. De totale breedte van de balken geeft de 'responsiveness' weer (het percentage van de toegevoegde aaltjes dat zich buiten de inoculatie-zone begeeft). De blauwe linkerbalk geeft het percentage aan dat naar de testvloeistof kruipt en de donkerrode rechterbalk het percentage dat naar de controlekant (water) gaat. De significantie van het verschil in oriëntatie in vergelijking met de demi-control is aangegeven met: ns= niet significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $P < 0.001$ (binomiale test).



Figuur 10. Respons en oriëntatie van *Meloidogyne chitwoodi* ten opzichte van verschillende grasextracten *in vitro*. De totale breedte van de balken geeft de 'responsiveness' weer (het percentage van de toegevoegde aaltjes dat zich buiten de inoculatie-zone begeeft). De blauwe linkerbalk geeft het percentage aan dat naar de testvloeistof kruipt en de donkerrode rechterbalk het percentage dat naar de controlekant (water) gaat. De significantie van het verschil in oriëntatie in vergelijking met de demi-control is aangegeven met: ns= niet significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $P < 0.001$ (binomiale test).

Discussie en Conclusies

Repellente (afstotende) effecten voor *Meloidogyne chitwoodi* zijn gevonden met extracten van lagere baktemperaturen in vergelijking met *Pratylenchus*. Blijkbaar reageren deze aaltjessoorten op verschillende stoffen. Uit andere experimenten is gebleken dat ook Koffie (ook een gebakken plantaardig product) significant repellent is voor *Meloidogyne*. Omdat in dit experiment 15 µl extract van verdunning 1/25 is toegepast op ca 1.5 ml agar kunnen we concluderen dat repellence in elk geval plaatsvindt in de range rond 1/2500 in water, hetgeen overeenkomt met ca. 0.04 g grasproduct per liter grond. Dit is lager dan de fytotoxische dosis (hoofdstuk 3.3). De duurzaamheid van het effect zal afhangen van de reactiedrempel van de aaltjes en de afbraaksnelheid van de intermediaire verbindingen in het product. De toepassing van grasproducten als repellente plantgat- of bandapplicatie, of mulch in de teelt van gewassen, verdient nader onderzoek.



Figuur 11. Voorbeeld van een agarstrookje voor in-vitro repellence onderzoek.

4.3 Nematoden-afweer door grasproduct bij planten in grond (soilbox)

Doel

Het vaststellen van nematoden repellente effecten van eerder in-vitro geteste grasextracten ter bescherming van waardplanten in grond in een speciale opstelling (soil-box genaamd).



Figuur 12. Bodemdoos (soilbox) opstelling in de kas. Elke box bestaat uit verschillende compartimenten. In de middelste daarvan staan tomaten en is de grond behandeld ter bescherming tegen aaltjes uit de naburige compartimenten.

Methoden

Repellence werd bestudeerd door verduurzaamd grasmateriaal (GT180-3) of andere organische materialen te mengen in grond (zilversand) in het centrale plantcompartiment van een 'bodendoos' (Fig. 12). De concentratie van het grasproduct was 0.18 g/l in 6 herhalingen; 18 g/l in 1 herhaling. In dit centrale compartiment, dat is afgeschermd met fijn gaas waardoor aaltjes wel, maar plantenwortels niet kunnen doordringen, werden 5 tomatenplanten geplant. In de aanpalende compartimenten werden enkele duizenden aaltjes aangebracht van soorten die in in-vitro experimenten werden afgeweerd door het grasproduct.

De bodemvochtigheid werd constant gehouden via een uitwisselaar met vaste zuigspanning (pF 1.3) en gedurende twee weken incubatie in de bodemdozen werd wekelijks 25 ml water in het plantcompartiment toegevoegd, zodat een minimale waterstroom van wortels naar aaltjes kon optreden.

De aaltjessoort *Pratylenchus penetrans* bleek in de eerste herhaling (pilot) niet naar de plant toe te komen in de controle. Daarom is alleen verder gewerkt met de soort *Meloidogyne chitwoodi* (een wortelknobbelaaltje). Twee weken na start van de proef werden de planten afzonderlijk overgezet in potten met zand waarna de in de wortels binnengedrongen wortelknobbelaaltjes zich gedurende 7 weken verder konden ontwikkelen tot wijfjes met eiproppen. Deze eiproppen werden geteld na schoonspoelen van de wortels en kleuren met Phloxine B.



Figuur 13. Gekleurde eiproppen van *Meloidogyne chitwoodi* op de wortels van een waardplant. Elke eiprop vertegenwoordigt een succesvol gesetteld en ontwikkeld wijfje van deze aaltjessoort.

Resultaten

Na analyse van alle 6 herhalingen van de dosis 0.18 g/liter grond blijkt dat GT180-3 met een gemiddelde reductie van de *Meloidogyne*-infectie van 35% tot de betere repellenten behoort (Tabel 5). Opvallende groeiremming van de planten (fytotoxiciteit) als gevolg van een van de behandelingen is bij de 0.18 g/l dosis niet waargenomen.

Tabel 5. Effect van verschillende organische toevoegingen op de bescherming van tomatenplanten tegen infectie door *Meloidogyne chitwoodi* (wortelknobbelaaltjes).

Behandeling	Formulering	Dosis	Gemiddeld aantal ei-proppen per 5 planten	Infectie % van blanco	Significantie LSD (p = 0,05)
Blanco	Onbehandeld	0 g/l	521	100	a
GT180-3	Poeder	0,18 g/l	338	65	d
Cayenne	Poeder	0,18 g/l	257	49	e
Ricinus leaf	Poeder	0,18 g/l	464	89	b
PH leaf	Poeder	0,18 g/l	415	80	c

Discussie en conclusies

Grasproduct 180-3 in een dosis van 0.18 g/ltr grond bij de wortels van tomaat verlaagt de infectie door wortelknobbelaaltjes significant met ca 35%. Dit effect kan niet worden verklaard door toxiciteit omdat die pas bij een 10x hoger concentratie (ca. 1 g/l grond) optreedt (zie 2.1). De conclusie lijkt daarom gerechtvaardigd dat het te danken is aan repellence (hoofdstuk 3.2).

De duur van de bescherming is in elk geval 1-2 weken. Dit was de maximale duur van de blootstelling aan infectieuze stadia van de aaltjes in deze proef. Langduriger bescherming is wenselijk en zal nader moeten worden onderzocht, ook in natuurlijke grond met een relevant gehalte organische stof. Het lijkt mogelijk een band-, plantkruit- of plantgatapplicatie te ontwikkelen. De concentratie rond de plant kan wegens gevaar voor fytotoxiciteit niet veel verder worden verhoogd, terwijl de prijs niet de belangrijkste beperking is.

4.4 Nematodenbescherming door grasproduct in tomatenteelt

Doel

Vaststellen van beschermend effect van grasproduct onder semi-praktijkomstandigheden.

Bepaling van het integrale effect op plantengroei en nematodeninfectie en -vermeerdering van toevoeging van een geselecteerd product als amendement bij tomaat in een potexperiment gedurende een teelt van ca 2 mnd.

Methode

Commercieel tomatenplantgoed werd bij een biologische teler geteeld in containers van 10 ltr, waarin o.a. GT 180-3 was gemengd door grond die van nature besmet was met *Meloidogyne incognita* en *M. hapla* (wortelknobbelaaltjes). Naast een grondbehandeling (4 g /ltr grond) werd ook nog elke 3 weken wat van het grasproduct bovenop de grond aangebracht (3x10 g per emmer). De totale dosis komt overeen met ca 14 ton/ha. Er was een controle zonder toevoegingen. Na 12 weken teelt werden de wortelstelsels uitgespoeld en beoordeeld op primaire en secundaire knobbel (1^e resp. 2^e aaltjesgeneratie) en op 'kurk' (veroorzaakt door de schimmel *Pyrenochaeta*). Daarnaast werd uit de geoogste en gewogen wortels aaltjes geëxtraheerd ter bepaling van de 3^e generatie *Meloidogyne*.

Resultaten

GT 180-3 had geen significant effect op de 1^e en 2^e generatie aaltjesknollen, hoewel het aantal 1^e generatie knollen als laagste uitkwam met 52% t.o.v. de controle. De 3^e generatie aaltjes was terug op het niveau van de controles. Er is waarschijnlijk een initieel effect geweest.

De 'kurk'-aantasting van de wortels (door bepaalde schimmels) was significant lager in GT-180-3 (46%) dan in de controle (100 %), maar de algemene wortelkwaliteit was niet significant beïnvloed.

Discussie en Conclusies

Er is een onderdrukkend effect van GT 180-3 op de wortelaantasting van tomaat door schimmels waargenomen. Aanwijzingen voor effecten tegen aantasting door wortelknobbelaaltjes zijn zwak. Alleen de primaire aantasting lijkt gevoelig voor de gebruikte dosis. Herhaling van deze proef is aan te bevelen. Het lijkt daarnaast verstandig om te onderzoeken of met de totale dosis van ca 14 ton/ha in één keer het effect tegen de eerste generatie kan worden geoptimaliseerd. Mogelijk is dan wel een wachttijd van enkele dagen nodig om fytotoxische stoffen te laten verdwijnen.



Figuur 14. Wortelstelsels van tomaat aan het einde van de emmerproef. Er zijn grote en kleine knobbels te zien als gevolg van primaire, respectievelijk secundaire aantasting door Meloidogyne spp.

5. Stabiliteit van grasvezelpreparaten

5.1 Bepaling van stabiliteit van producten van verschillende baktemperatuur

Doel

Bepaling van de afbraaksnelheid van graspreparaten geproduceerd bij verschillende torrefactie temperaturen. Stabiliteit van verduurzaamd gras is een belangrijke parameter voor de bruikbaarheid van het product. Deze eigenschap is afhankelijk van het bakproces en kan tevens een indicatie geven van de fractie snel afbreekbare verbindingen die waarschijnlijk betrokken zijn bij fytotoxische en nematotoxische en –reppelente effecten. Stabiliteit van een organisch product kan worden bepaald door het meten van gewichtsafname tijdens afbraak (onder vochtige omstandigheden in aanwezigheid van micro-organismen) of door het meten van CO₂, dat vrijkomt onder omstandigheden waarin afbraak mogelijk is. In dit project is gebruik gemaakt van een methode voor continue bepaling van CO₂-productie. Deze methode werkt met gasdichte incubatieflessen, waarin de geproduceerde CO₂ wordt geabsorbeerd met loog. Hierdoor ontstaat in de flessen een drukverschil dat gerelateerd is aan de hoeveelheid verademd materiaal en dus aan de stabiliteit van het geïncubeerde product. Via een drukmeter die met vaste tijdsintervallen de druk registreert, kan een inzicht verkregen worden in het verloop van het afbraakproces in de tijd.

Methoden

Per pot werd 10 g luchtdroog materiaal vermengd met 83 mg NPK meststof en op 60 % water (grasproduct) of 66 % water (veen) gebracht. Het materiaal werd geïnoculeerd met grondsuspensie (0.00005 g grond in 15 ml vloeistof) en geïncubeerd bij 25 °C gedurende 42 dagen. Aan het begin en het einde van het experiment is de totale hoeveelheid droog materiaal per incubatiefles bepaald, zodat de afbraak ook via het gewichtsverlies in de tijd bepaald kon worden. Het drukverloop werd bepaald met Sensomat drukmeters, die automatisch de druk registreren en digitaal opslaan. Gedurende de incubatieperiode werd iedere 168 minuten de druk bepaald. Indien de druk lager werd dan -200 HPa werden de incubatieflessen herbelucht, om te voorkomen dat de onderdruk te zeer opliep en de zuurstof beperkend zou worden voor het afbraak proces.

De volgende substraten zijn in het experiment onderzocht: witveen (als standaard voor een stabiele grondstof voor potgrond) en gras materiaal met torrefactietemperaturen van 0 (onbehandeld), 180, 200, 220, 240 en 260 °C. Het experiment is in drievoud uitgevoerd.

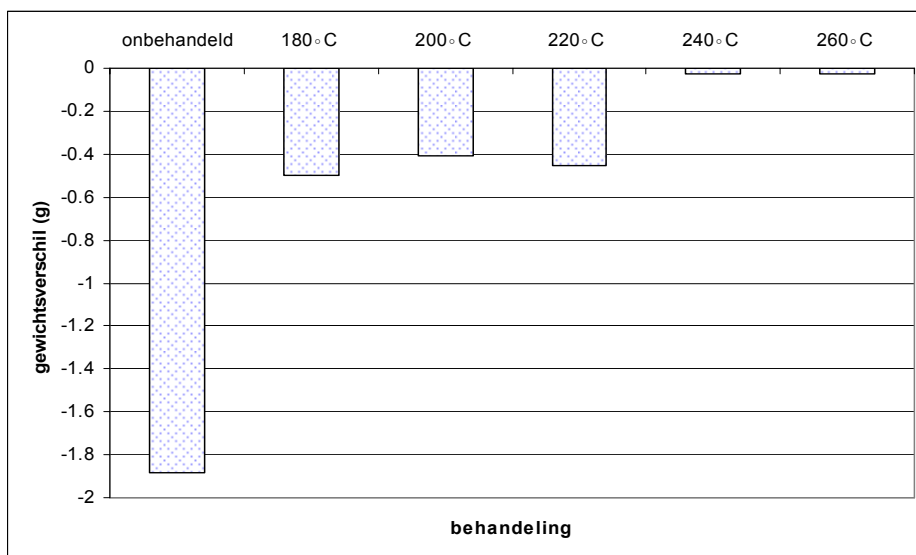
De drukwaarden zijn per pot geregistreerd en opgeslagen in de computer. Per unit zijn de resultaten gecorrigeerd voor de effecten van het herbeluchten van de flessen. De tijdscurven van de drukafname zijn geanalyseerd met behulp van de Gompertz-vergelijking:

$$\text{Druk}_t = C * \text{EXP}(-\text{EXP}(-B*(t-M)))$$

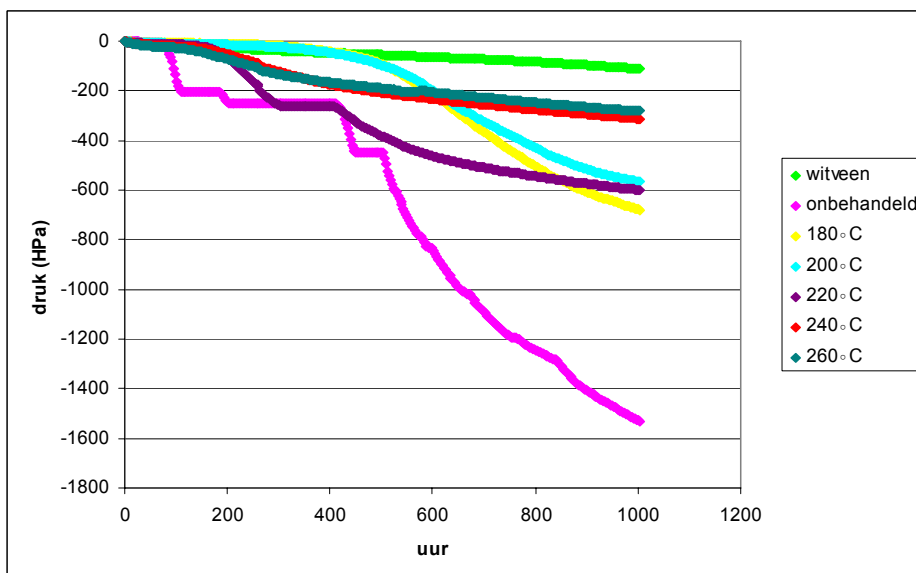
waarbij t de tijd (in uren) is en C, B en M te schatten parameters van de vergelijking zijn. De Gompertz curve is een sigmoïdale curve, die gebruikt wordt voor het beschrijven van groeiprocessen met een maximum, zoals microbiële groei op een beperkte hoeveelheid substraat. Kenmerkend voor de Gompertz curve is dat de curve niet-symmetrisch rond het buigpunt hoeft te zijn. Het buigpunt wordt gegeven door de parameter M. De waarde van M geeft aan hoelang de aanloopfase van het afbraakproces is. De parameter C is een maat voor de maximale waarde van de curve, in dit geval dus voor de totale afbreekbaarheid van het geïncubeerde materiaal. Parameter B is een maat voor de steilheid van de curve rond het buigpunt. De curven van het onbehandelde materiaal en één curve van het materiaal van 220°C vertonen vlakke stukken door lekkage tijdens de meting. De meetwaarden zijn hiervoor gecorrigeerd voor het fitten van de Gompertz vergelijking.

Resultaten

Het gewichtsverlies van de verschillende substraten is weergegeven in Figuur 15. Vanwege het feit dat het materiaal luchtdroog is ingewogen is het watergehalte van het witveen aan het begin van het experiment anders geweest dan van de overige substraten. Hierdoor zijn de resultaten van de witveenmonsters niet te vergelijken met de overige monsters en zijn ze niet weergegeven. Het blijkt dat het onbehandelde materiaal verreweg het minst stabiel was. De materialen die bij 180, 200 en 220 °C behandeld waren, hebben een middelmatige stabiliteit. De materialen uit de behandelingen van 240 en 260°C vertoonden de hoogste stabiliteit.



Figuur 15. Gewichtsverskil van de geïncubeerde gras-materialen tussen het begin en het einde van het experiment.



Figuur 16. Verloop van de druk in afgesloten flessen met gras dat op verschillende temperaturen verduurzaamd is. Witveen werd gebruikt als vergelijking.

De resultaten van de drukmeting (Figuur 16) komen overeen met de bepalingen van het gewichtsverlies. Onbehandeld gras was verreweg het minst stabiel. Materiaal dat bij 180, 200 en 220°C verduurzaamd is, was middelmatig stabiel, terwijl de materialen uit de 240 en 260°C behandeling het meest stabiel waren. Alle grasproducten waren minder stabiel dan witveen. De wiskundige analyse van het verloop van de druk is samengevat in Tabel 6.

Tabel 6. Parameters van de Gompertz vergelijking van de verschillende drukverlies-curven.

	B ¹	C ² (HPa)	M ³ (uur)
Witveen	0.001741	168.58	569.80
Onbehandeld	0.007662	1476.51	196.65
180°C	0.004637	845.91	663.20
200°C	0.004318	722.76	722.76
220°C	0.007305	579.35	286.15
240°C	0.004465	302.20	307.29
260°C	0.004056	270.74	267.95

¹ Snelheid van het proces bij het buigpunt van de curve (na M uur)

² Totaal drukverschil aan het einde van het proces

³ Tijdstip waarop het buigpunt van de curve bereikt is

Het voorspelde eindniveau van de druk (gegeven door parameter C) komt goed overeen met de stabiliteit van het materiaal, zoals bepaald via weging. De ligging van het buigpunt in de verschillende curven (parameter M) laat zien dat het afbraakproces van de producten van 180 en 200°C in het begin duidelijk vertraagd was. In het eerste stadium van de afbraak verliep het proces van deze producten zelfs langzamer dan de afbraak van witveen. In een later stadium versnelde de afbraak echter duidelijk en uiteindelijk bleken de producten van 180 en 200°C minder stabiel dan de producten van 240 en 260°C en witveen.

Discussie en conclusies

Het blijkt duidelijk dat de torrefactietemperatuur de stabiliteit van de grasproducten sterk beïnvloedt. De producten gemaakt bij torrefactietemperaturen tot en met 220°C zijn duidelijk minder stabiel dan de producten van 240 en 260°C. Torrefactie bij lagere temperaturen verduurzaamt het gras wel in vergelijking met onbehandeld gras. Geen van de verduurzaamde producten was zo stabiel als witveen.

De producten van 180 en 200°C vertoonden een duidelijke remming van de afbraak in het begin van het afbraakproces. Op grond van de wiskundige analyse kan geconcludeerd worden dat het afbraakproces van deze producten met 405 uur (16.9 dagen) vertraagd is. De meest waarschijnlijke verklaring is dat bij lagere torrefactietemperaturen stoffen ontstaan zijn, die de micro-organismen verantwoordelijk voor de afbraak geremd hebben. Een opvallend punt is dat juist de producten van 180 en 200°C ook stoffen bevatten die toxisch of repellent voor nematoden zijn. De suggestie dat het hierbij om dezelfde stoffen gaat, ligt voor de hand, maar is nog niet bewezen.

De gebruikte methode om de afbraak in de tijd te volgen lijkt zeer geschikt. Technische problemen met lekkage zijn inmiddels opgelost. Het grote voordeel van de gebruikte methode t.o.v. eindpuntbepalingen is dat ook gegevens over het verloop van het proces verzameld worden. Via de wiskundige analyse kunnen parameters bepaald worden waarmee verschijnselen zoals de aanwezigheid van remmende stoffen kunnen worden vastgesteld.

6. Algemene conclusies en aanbevelingen

Getorreficeerd gras dat is gebakken bij een temperatuur tussen 180 en 220 °C bevat stoffen die toxisch kunnen zijn voor planten en nematoden (aaltjes). De gevoeligheid van zaailingen, grotere planten en nematoden verschilt (zie Tabel 7). Deze grasproducten bevatten tevens stoffen die repellent zijn voor aaltjes.

Tabel 7. Overzicht van effecten van getorreficeerd gras (180 °C) in oplopende doseringen bij verschillende organismen. Waterdoses zijn vertaald in grond doses onder de aanname van een bodemvochtigheid van 10% v/v. Dosering per ha is uitgaande van een volveldse toepassing in een bouwvoor van 25 cm dik.

Doelorganisme	Latijnse naam	1 g/ltr water 0.1 g/ltr grond 0.25 ton/ha	10 g/ltr water 1 g/ltr grond 2.5 ton/ha	100 g/ltr water 10 g/ltr grond 25 ton/ha
Zaailing tuinkers	<i>Lepidum sativum</i>	Geen effect	Geen effect	Enige remming
Zaailingen sla	<i>Lactuca sativa</i>	Onbekend	Enige remming	Sterke remming
Plant chrysant	<i>Chrysanthemum</i>	Groeiremming	Groeiremming	Groeiremming
Plant tomaat	<i>Lycopersicon sp</i>	Geen effect	Geen effect	onbekend
Wortellesieaaltje	<i>Pratylenchus sp</i>	Geen effect	Geen effect	onbekend
Wortelknobbelaaltje	<i>Meloidogyne sp</i>	Repellent	Toxisch/statisch Repellent	Toxisch/statisch

Nematotoxiciteit

Van de aaltjes is *Meloidogyne* (wortelknobbelaaltjes) gevoeliger voor laag-gebakken grasproduct dan *Pratylenchus* (wortellesieaaltjes), maar bij een concentratie van ca 4 g/ltr grond is de remming van *Meloidogyne* nog niet volledig. Voor een volledig 90% effect is ca. 10 g/ltr grond nodig. Bij een volvelds behandeling van een bouwvoor van 25 cm diepte komt dat neer op 25 ton per ha. Gezien de kosten zal vermoedelijk slechts plaatselijke behandeling (stroken of plantgat) haalbaar zijn. Een eerste containerproef indiceert dat de primaire infectie van *Meloidogyne* bij tomaat mogelijk kan worden gehalveerd bij een dosis van 4 g/ltr grond. Verder onderzoek onder semi-praktijkomstandigheden waarbij zowel aaltjesremming als -repellence kan optreden lijkt zinvol. Daarnaast moet onderzocht worden of de activiteitsremmende effecten bij *Meloidogyne* lethaal zijn of nematostatisch, en tevens hoe lang het werkzaam is. De in-vitro activiteitstest is een nuttig instrument voor het monitoren van de optimalisering van het productieproces van getorreficeerd gras voor verschillende toepassingen.

Nematoden repellence

Aaltjes-repellentie treedt op bij *Meloidogyne* en al bij vrij lage doses. Hier lijkt een aardig aanvullend perspectief te liggen voor praktische toepassing als grondbehandeling (band- of plantgat-applicatie) en/of als mulch. Wel is het de moeite waard te verkennen hoe de afgifte en afbraak van de werkzame stoffen is en of dit mogelijk door 'slow-release' formulering kan worden verbeterd. Het gebruik als repellent voor *Pratylenchus* lijkt door diens 'sit-and-wait' gedrag in grond geen perspectief te hebben, ofschoon wel in-vitro effecten gevonden zijn. Opvallend is dat dit laatste aaltje ook beter dan de andere kan functioneren in hyperresponsieve (o.a. polyfenolen) of gedeeltelijk rottende wortels.

Fytotoxiciteit

Met name de laag-gebakken grasproducten bevatten stoffen die de kieming van sla remmen, terwijl tuinkers minder gevoelig is. Kiemremming bij sla treedt op bij een dosis van 1/25, hetgeen overeenkomt met ca 4 gram grasproduct per liter grond, en lijkt voornamelijk irreversibel. Mogelijk biedt dit perspectieven in de richting van onkruidbestrijding. De kiemtest kan een nuttig instrument zijn bij de optimalisering van het productieproces van grasproducten voor verschillende toepassingen.

Met doses grasproduct vanaf 0.1 g/l grond (ofwel ca 1 g/ liter bodemwater) moet bij sommige planten (o.a. Chrysant) voorzichtig worden omgesprongen. Mogelijk is een wachttijd van enkele dagen waarin de toxische stoffen worden afgebroken afdoende voor veilige teelt. Onderzoek hiernaar is aan te bevelen wanneer een bij lage-temperatuur gebakken product wordt beoogd te worden ingezet als mulch of pre-plant bodembehandeling. De dosis waarbij minder dan 10% fytotox optreedt in chrysant ligt vermoedelijk rond de 0.01 g/l grond. Tomaat is wat minder gevoelig dan Chrysant. Daarom lijkt toepasbaarheid als pre-plant aaltjesdoder en/of post-plant aaltjesrepellent met name tegen *Meloidogyne* bij tomaat perspectief te hebben.

Stabiliteit

Om uit gras een stabiel substraat te maken zijn baktemperaturen nodig van minimaal 240 °C. Bij deze temperaturen zijn de toxische effecten (veel) geringer dan bij lagere temperaturen. De procescondities nodig voor het maken van een werkzaam preparaat tegen aaltjes zijn dus anders dan die voor het maken van een stabiel substraat voor de tuinbouw.