

NN31545.1050

NOTA 1050 ^H

april 1978

Instituut voor Cultuurtechniek en Waterhuishouding
Wageningen

ORGANISCHE STOF IN GROND ALS MAAT
VOOR DE DENITRIFICATIESNELHEID

A. Cobussen

Nota's van het Instituut zijn in principe interne communicatiemiddelen, 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



JSN 264991 *

1. INLEIDING

Nitraat kan uit bodem en water verdwijnen door biochemische denitrificatie. Hierbij wordt het nitraat omgezet in stikstofgassen die naar de atmosfeer verdwijnen. De denitrificatiesnelheid hangt in belangrijke mate af van de aanwezigheid van organische stof, die door bacteriën kan worden benut. De organische stof is niet alleen aanwezig in de bodemoplossing, maar komt ook voortdurend vrij uit het bodemmateriaal.

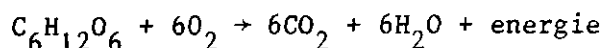
Om informatie te krijgen over de beschikbaarheid van organische stof voor denitrificatie op langere termijn kan een grondextractie worden uitgevoerd. In het extract kan op verschillende wijzen de aanwezige organische stof worden geanalyseerd. In deze nota wordt vooral aandacht besteed aan de anthronmethode (GIESEKING, 1975).

STANFORD e.a. (1975) vonden een goed verband tussen de denitrificatiesnelheid in grond en de hoeveelheid organische stof in het grondextract gemeten volgens de anthronmethode. De resultaten verkregen met de anthronmethode worden vergeleken met de bepaling van de C.O.D. (Chemical Oxygen Demand) en T.O.C. (Total Organic Carbon) in het grondextract van dezelfde grond en tevens met de zuurstofconsumptie en het organische stofgehalte van deze grond.

2. PROBLEEMSTELLING

De aanleiding voor dit onderzoek is het vinden van een maat voor de beschikbare organische stof in grondmonsters voor biochemische denitrificatie. De organische stof dient als energiebron voor bacteriën. Hierbij vindt met vrije zuurstof oxidatie plaats van

organische stof volgens:



Indien een tekort aanwezig is van vrije zuurstof kunnen bepaalde bacteriën de zuurstof van het nitraat benutten voor de oxidatie van organische stof. De beschikbare organische stof kan in principe worden gemeten door de denitrificatiesnelheid vast te stellen aan de hand van gasvormige stikstofverbindingen die daarbij ontstaan. Aangezien dit een tijdrovende procedure is, verdient een indirecte methode de voorkeur. Mogelijkheden hiertoe zijn:

- van een grondmonster de zuurstofconsumptie meten onder aerobe omstandigheden (bijv. met de sapromat)
- in een grondextract de organische stof meten met behulp van diverse methoden zoals de anthronmethode, de T.O.C. en C.O.D.

Snelheid van zuurstofgebruik geeft directe informatie over denitrificatiesnelheid maar is eveneens een langdurende bepaling.

Via de anthronmethode kunnen de direkt afbreekbare stoffen worden bepaald. De invloed van diverse reagentia op deze bepaling dient te worden nagegaan, o.a. extractietijd, extractiemiddel, wachttijd na verwarming.

3. DE ANTHRONMETHODE

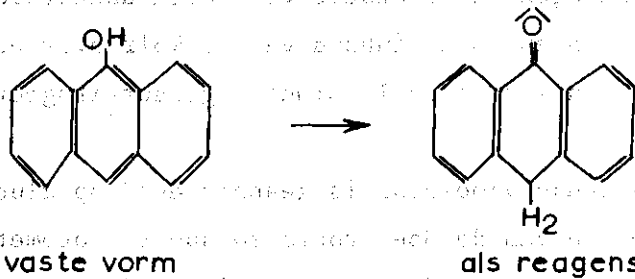
3.1. P r i n c i p e

Veel suikers en vooral hexosen vormen met anthron gekleurde verbindingen. De reactie vindt onder verwarming plaats in een sterk zuur milieu, waarbij eventueel aanwezige polysacchariden worden omgezet in monosacchariden. De monosacchariden condenseren dan met anthron tot een groene verbinding welke colorimetrisch kan worden gemeten en waarvan het absorptiemaximum ligt bij 630 nm.

De metingen worden vergeleken met die van een standaardglucose-oplossing. Aangezien er in de grondextracten niet alleen glucose maar ook andere suikers voorkomen is het niet terecht de resultaten uit te drukken in mg glucose. Om toch aan te kunnen geven hoeveel totaal suiker er aanwezig is, worden de resultaten uitgedrukt in 'glucose-equivalenten'.

3.2. Reagentia

Als reagens wordt gebruik gemaakt van anthron (m.p. 154°C Merck). Anthron (C₁₄H₁₀O, 9,10 dihydro-9-oxoanthracene met molgew 194,24) is bij kamertemperatuur een kleurloze, stabiele vaste stof, die niet oplost in water, maar wel in geconcentreerd zwavelzuur (gele kleuring).



Het anthronreagens is bereid door 0,1g anthron met 500 ml geconcentreerd zwavelzuur te vermengen en voorzichtig 200 ml water toe te voegen (GOLTERMAN, 1970). Als antioxidant is 1g ureum toegevoegd. Het reagens is bewaard bij -20°C en is dan 2 weken houdbaar.

- 0,01 m calcium chloride; 1,472 CaCl₂ · 2 H₂O p.a. Merck opgelost in 1 liter water
- 0,01 m natrium bicarbonaat; 0,840 g NaHCO₃ p.a. Merck, opgelost in 1 liter water
- kaliumnitraat p.a. Merck
- glucose p.a. Merck

3.3. Werkwijze

3.3.1. Direkte methode

Extraheerbare 'glucose-equivalenten' zijn bepaald met behulp van de anthronmethode en een standaardglucosecurve.

Voor extractie is 10 g gezeefde grond ingewogen in een platbodemkolf van 250 ml (COD kolf). Hieraan is een zodanige hoeveelheid 0,01 m calciumchloride toegevoegd, dat de glucoseconcentratie in het extract ongeveer 100 mg/l was ($\frac{x}{20}$ ml x = te verwachten glucosegehalte in mg/kg grond).

Aangezien verschillende grondsoorten veel water absorberen is het soms noodzakelijk extra calciumchlorideoplossing toe te voegen om een extract te kunnen krijgen.

Om te corrigeren voor het verlies door verdamping is de kolf voor het koken gewogen. Hierna is op de kolf een terugvloeikoeler geplaatst en de oplossing gedurende 3 uur gekookt. Na afkoelen is de kolf weer gewogen en eventuele verliezen aangevuld met demi-water. Na gemengd te hebben is de inhoud van de kolf overgebracht in een centrifugebuis en gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 9000 toeren.

De bovenstaande vloeistof is geanalyseerd op glucose. Hiertoe is in de cuvetten van de Spectronic 20 spectrofotometer, 5 ml anthron reagens (0°C) gepipetteerd, waarna 1 ml grondextract (4°C) is toegevoegd.

Na mengen met behulp van de reageerbuizenschudder zijn de cuvetten gedurende exact 20 minuten op een waterbad bij 100°C verwarmd. Hierbij ontstaat de groene kleuring. De extincties zijn, gemeten bij 630 nm (λ max) tussen 20 en 60 minuten na de beëindiging van het verwarmen en zijn vergeleken met een ijklijn van glucosestandaards die ieder eenzelfde hoeveelheid 0,01 M calciumchloride bevatten.

3.3.2. Standaard additie methode

Indien er componenten aanwezig zijn, die storen bij de bepaling, is de storing opgeheven door gebruik te maken van de standaard additie techniek. Hierbij is aan het te analyseren monster verschillende hoeveelheden van een standaardglucoseoplossing toegevoegd (0-300 mg/l). Van al deze oplossingen zijn de extincties gemeten, en uitgezet tegen de hoeveelheid toegevoegde glucose (fig. 1).

De afsnijding van de X-as is dan het glucose-gehalte van het monster.

Het voordeel van deze methode is dat eventuele aanwezige storingen alle metingen evenveel beïnvloeden, waardoor alleen de helling van de uit te zetten lijn is beïnvloed en niet de afsnijding (het glucose-gehalte).

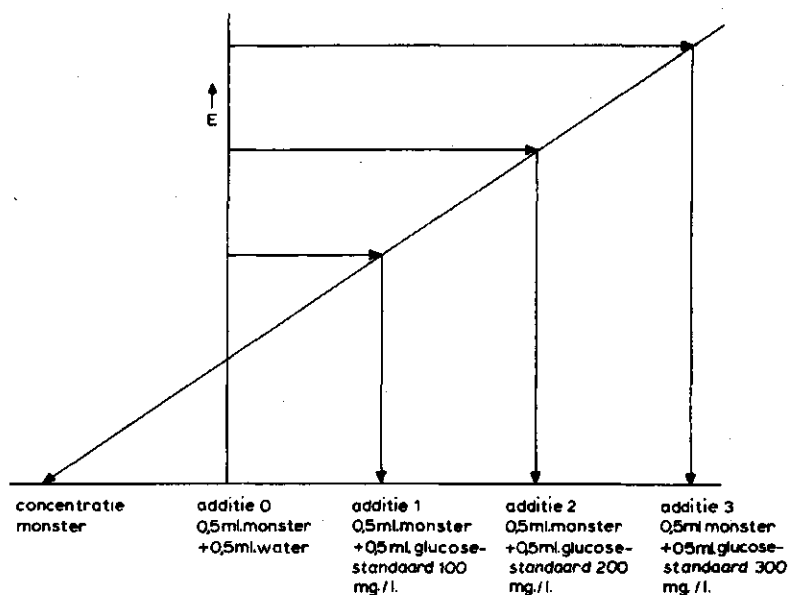


Fig. 1. Voorbeeld van de standaardadditietechniek

De glucose-equivalenten in het extract kunnen worden bepaald door in de cuvetten achtereenvolgens te pipetteren:

cuvet 1: 5 ml anthron + $\frac{1}{2}$ ml monster + $\frac{1}{2}$ ml water

2: 5 ml anthron + $\frac{1}{2}$ ml monster + $\frac{1}{2}$ ml glucosestandaard 100 mg/l

3: 5 ml anthron + $\frac{1}{2}$ ml monster + $\frac{1}{2}$ ml glucosestandaard 200 mg/l

4: 5 ml anthron + $\frac{1}{2}$ ml monster + $\frac{1}{2}$ ml glucosestandaard 300 mg/l

Hiervan zijn de extincties gemeten. De afsnijding van de Y-as is bepaald met behulp van de methode der kleinste kwadraten.

3.4. Factoren die de kleurreactie beïnvloeden

3.4.1. Het anthronreagens

In eerste instantie is gewerkt met het reagens beschreven door JENKINSON (1963) (1 g anthron + 475 ml geconcentreerd zwavelzuur + 37,5 ml demiwater). Dit reagens gaf echter slecht reproduceerbare waarden.

Hierom is overgestapt op een minder geconcentreerd reagens beschreven door GOLTERMAN (1970) (zie 3.2).

Volgens JENKINSON (1968) gaf anthron gezuiverd door middel van herkristallisatie uit benzeen/petroleumether 60-80°C 1:1 (zie bijlage) betere resultaten. Het effect van de zuivering is nagegaan door verschillende glucose standaards te bepalen met het gezuiverde en niet gezuiverde anthron. De resultaten staan weergegeven in tabel 1.

Tabel 1. Invloed zuivering anthron op de gemeten extincties

Glucose equivalenten (mg/l)	Ongezuiverd anthron extinctie	Gezuiverd anthron extinctie
40	0,181	0,191
100	0,203	0,230
140	0,267	0,323
200	0,408	0,461
250	0,510	0,577
300	0,632	0,698
400	0,910	1,020

Uit tabel 1 blijkt dat het gezuiverde anthron hogere extincties geeft. Tevens blijkt dat het verband tussen de extinctie en de hoeveelheid glucose rechtlijnig is, tot 300 mg. Boven 300 mg werden geen reproduceerbare waarden meer verkregen.

3.4.2. Invloed verwarmingstijd en wachttijd na verwarming

De invloed van de verwarmingstijd van het reactiemengsel is nagegaan door de extinctie van een standaard glucoseoplossing (100 mg/l) te meten na verschillende verwarmingstijden. Tevens is nagegaan of de kleur na verwarmen nog veranderde. De resultaten staan weergegeven in fig. 2.

Uit fig. 2 blijkt, dat een verwarmingstijd van 20 minuten voldoende is. De kleur was van 20 tot 60 minuten na verwarmen maximaal. Bij alle metingen bleek het absorptiemaximum te liggen bij 630 nm.

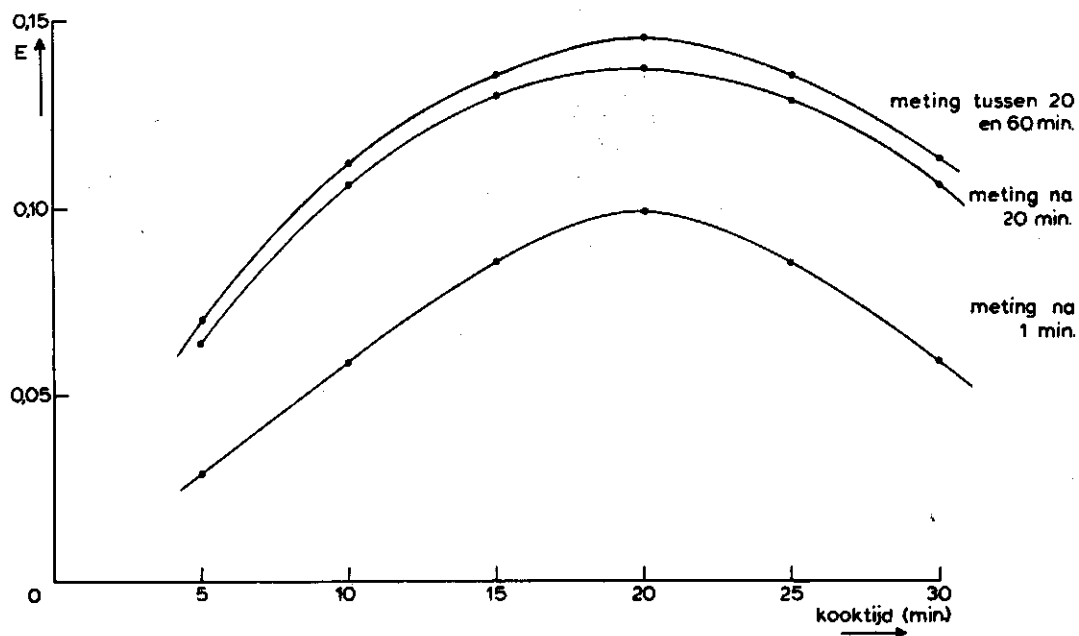


Fig. 2. Invloed verwarmingstijd en wachttijd na verwarming

3.4.3. Invloed nitraat

In de grond komt nitraat voor. Het is daar ontstaan doordat chemo-autotrofe bacteriën ammonium, dat bij mineralisatie gevormd is, oxyderen tot nitriet, waarna de bacterie Nitrobacter het nitriet verder oxydeert tot nitraat.

Indien aangenomen dat in het bodemvocht van de grondmonsters nitraatconcentraties voorkomen van maximaal 100 mg/l, is berekend dat de uiteindelijke concentratie in de extractievloeistof ca. 5 mg $\text{NO}_3\text{N/l}$ bedraagt. Er is nagegaan in hoeverre het nitraat stoort bij de kleurvorming door aan een glucose standaard van 200 mg/l nitraat toe te voegen tot 7,3 mg $\text{NO}_3^- \text{-N/l}$. De extincties zijn gemeten en weergegeven in fig. 3.

Uit fig. 3 blijkt dat het nitraat stoort bij de kleurvorming. Voor een nauwkeurige meting is het dus noodzakelijk het nitraatgehalte van te voren te meten en aan de standaardmonsters dezelfde hoeveelheid nitraat toe te voegen. Indien dit niet is gedaan, is een fout van $\pm 2,5\%$ per mg $\text{NO}_3^- \text{-N/l}$ in de extractievloeistof te verwachten.

Een eenvoudige manier om de storing door nitraat op te heffen is de standaard additie techniek (zie 3.3.2).

3.4.4. Invloed calciumchloride

Daar er met een CaCl_2 -oplossing wordt geëxtraheerd is het noodzakelijk om na te gaan of CaCl_2 van invloed is op de bepaling. Hiertoe zijn aan glucosestandaardmonsters (200 mg/l glucose) verschillende hoeveelheden calciumchloride toegevoegd (0-0,02 m). Het CaCl_2 -gehalte van 0,01 m komt overeen met de CaCl_2 -concentratie in het extractiemiddel. De glucosegehalten zijn bepaald en de gemeten extincties staan weergegeven in fig. 3.

Uit fig. 3 blijkt dat er een duidelijke toename is van de gemeten extinctie met de hoeveelheid calciumchloride. Het is dus noodzakelijk dat de standaards evenveel CaCl_2 bevatten. Een tweede methode om de storing door CaCl_2 tegen te gaan is de standaard additie methode (zie 2.5).

3.4.5. Invloed natriumbicarbonaat

Het is ook mogelijk de grond te extraheren met natriumbicarbonaat. Om de storing hiervan na te gaan zijn aan de glucosestandaardmonsters (200 mg/l) verschillende hoeveelheden natriumbicarbonaat toegevoegd (0 - 0,02m). Het NaHCO_3 -gehalte van 0,01 m komt overeen met de NaHCO_3 -concentratie in het extractiemiddel.

Uit de gemeten extincties (fig. 3) is niet duidelijk dat er van enige beïnvloeding sprake is. Terminste de invloed van natriumbicarbonaat is niet groter dan de normale spreiding van de analyseresultaten.

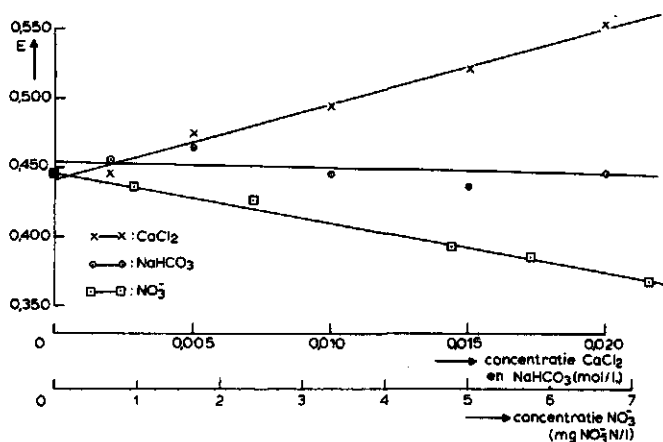
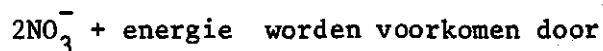
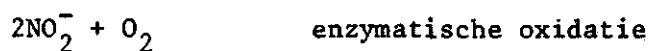
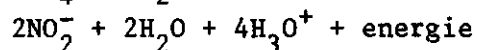


Fig. 3. Invloed CaCl_2 , NaHCO_3 en NO_3^- -N

3.4.6. Invloed N-serve

De biologisch afbreekbare organische stof kan worden bepaald door het zuurstofverbruik te meten met behulp van de sapromat. Aan- gezien voor de oxidatie van ammonium tot nitraat ook zuurstof nodig is, moet dit nitrificatieproces: $2\text{NH}_4^+ + 3\text{O}_2$ enzymatische oxidatie



de toevoeging van N-serve. Om de mogelijke invloed van N-serve op de anthronmethode na te gaan is een verzadigde oplossing van N-serve gemaakt. Aan deze oplossing zijn verschillende hoeveelheden glucose toegevoegd (40 - 300 mg/l) en de oplossingen zijn gemeten. De gemeten extincties zijn weergegeven in tabel 2 en vergeleken met monsters zonder N-serve.

Tabel 2.

Glucose equivalenten (mg/l)	Gemeten extinctie zonder N-serve	Gemeten extinctie met N-serve
40	0,078	0,078
100	0,213	0,213
140	0,318	0,312
200	0,446	0,437
250	0,515	0,508
300	0,677	0,690

Uit tabel 2 blijkt dat N-serve geen significante verschillen geeft.

3.5. Nauwkeurigheid van de methode

Voordat de afsnijding met de X-as wordt berekend, moet er gekeken worden naar uitschieters in de gemeten extincties. Deze uitschieters

worden namelijk bij de methode der kleinste kwadraten even zwaar meegeteld als de andere punten. Ze geven daardoor een vertekend beeld van de lijn en kunnen daarom beter niet worden meegenomen met de berekening.

Uit 11 paren gegevens van verschillende grondsoorten is de standaard-afwijking σ voor de standaard additie methode berekend. Deze is gelijk aan $\sigma = 7$ mg glucose/kg droge grond.

4. EXTRACTIEMETHODE

GIESELING (1975) geeft verschillende methoden om de carbohydraten uit de grond te extraheren en wel met 0,01 m calciumchloride, natriumbicarbonaat en water. Er is nagegaan welke extractiemethode het best voldeed.

Natriumbicarbonaat gat meteen al slechte resultaten doordat de humuszuren ook oplostten en waardoor een bruin gekleurd extract werd verkregen, wat stoorde bij de bepaling.

Het waterextract gaf iets hogere extinctiewaarden dan het calciumchlorideextract maar dit bleek veroorzaakt te zijn doordat in het waterextract ook een weinig humuszuren oplostten. Als de extincties gecorrigeerd werden met een blanco extinctie (aan het reagens werd geen anthron toegevoegd) werden dezelfde resultaten verkregen (zie tabel 3).

Tabel 3. Vergelijking van extractie met water en met 0,01 m CaCl_2

Extracten	Extinctie met anthron	Blanco extinctie zonder anthron	Gecorrigeerde extinctie
water	0,710	0,064	0,646
	0,755	0,066	0,689
	0,735	0,069	0,726
CaCl_2	gem. 0,733	gem. 0,066	gem. 0,687 $\sigma_{\bar{x}}=0,023$
	0,658	0,028	0,630
	0,720	0,035	0,685
	0,740	0,037	0,703
	gem. 0,706	gem. 0,033	gem. 0,673 $\sigma_{\bar{x}}=0,022$

4.1. Kooktijd

STANFORD e.a. (1971) geven als extractietijd een $\frac{1}{2}$ à 1 uur aan.

Bij dit onderzoek is gebleken dat bij een kooktijd van ongeveer een $\frac{1}{2}$ uur de glucosegehalten in het extract sterk worden beïnvloed door enkele minuten korter of langer koken. Bij een kooktijd van 3 uur is dit effect nihil (zie fig. 4). Hierom is gekozen voor een extractietijd van 3 uur. Langer extraheren geeft iets hogere glucosegehalten, maar dit stuit op praktische bezwaren aangezien dan de oplossingen kunnen droogdampen en de analyse niet meer op één dag kan worden afgemaakt.

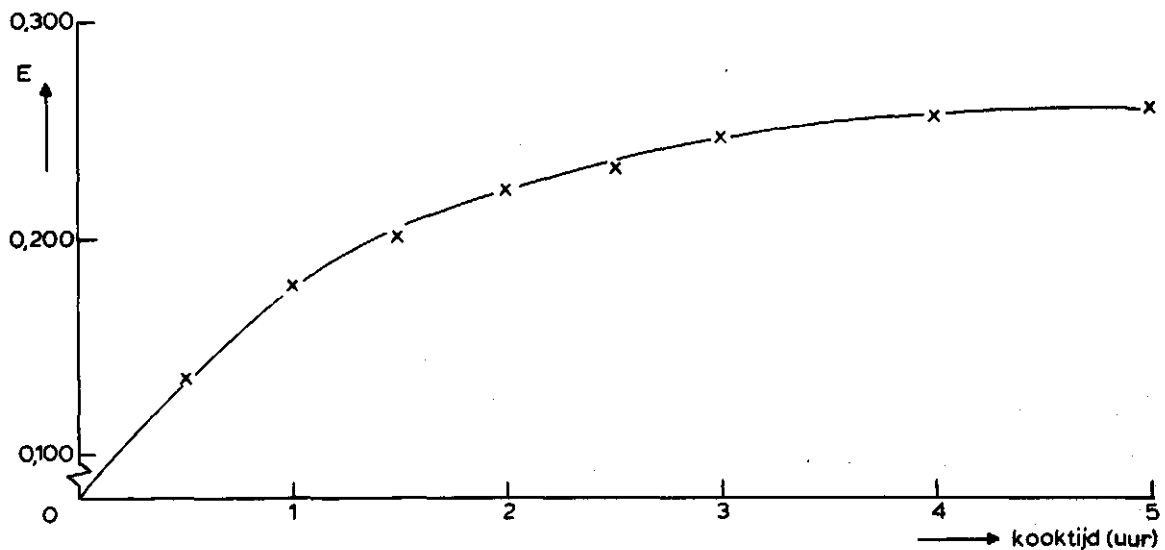


Fig. 4. Invloed kooktijd

5. VERGELIJKING VERSCHILLENDE PARAMETERS VOOR DE HOEVEELHEID DIREKT AFBREEKBARE ORGANISCHE STOF

Niet alleen de hoeveelheid glucose-equivalenten, bepaald met de anthronmethode, is een maat voor de direkt afbreekbare organische stof, maar ook de C.O.D. (Chemical Oxygen Demand) en de T.O.C. (Total Organic Carbon) van het grondextract. Ook het organische stofgehalte en de zuurstofconsumptie kunnen een maat zijn voor de afbreekbare organische stof. Al deze methoden zijn voor enkele gronden met elkaar vergeleken.

De C.O.D. is bepaald in hetzelfde grondextract en wel volgens de methode beschreven in NEN 3235. Het monster wordt gedurende 2 uur gekookt met een bekende hoeveelheid kaliumdichromaat en zwavelzuur, waarna de overmaat bichromaat wordt teruggetitreerd met ferro-ammonium-sulfaat (ferroïne als indicator).

Ook de T.O.C. is in ditzelfde extract bepaald. De T.O.C. is bepaald met de Total Organic Carbon analyser model 915A van BECKMAN. Hiertoe is in een aangezuurd grondextract anorganisch CO₂ uitgedreven door er stikstof door te leiden. Vervolgens is het monster geïnjecteerd in de hete ovenbuis waarin zich cobaltoxide als katalysator bevindt. Het organisch koolstof wordt omgezet in kooldioxide, wat wordt gemeten.

Van de grond is het organisch stofgehalte bepaald volgens de gloeiverliesmethode. Door het verhitten van het grondmonster verdwijnt het vocht dat in de grond aanwezig is, terwijl de organische stof verbrand wordt. Deze methode is niet geschikt voor de bepaling van organische stof in klei. Aangezien klei een hoeveelheid chemisch gebonden water en kalk kan bevatten, is de organische stof in klei, zavel en löss bepaald volgens de methode van Kurmies. Hierbij wordt de organische stof geoxydeerd met behulp van dichromaat en zwavelzuur en evenals bij de C.O.D. titrimetrisch bepaald.

De zuurstofconsumptie van de grond is bepaald met de Sapromat. Dit apparaat is eigenlijk gemaakt voor de bepaling van de zuurstofconsumptie in afvalwater. Hiertoe wordt een hoeveelheid afvalwater in een kolf overgebracht. Als er zuurstof wordt geconsumeerd, daalt de druk in de kolf en gaat er een stroompje lopen door een elektrolysecel die zuurstof ontwikkelt. Zodra de druk weer op peil is stopt de electrolyse. De totale hoeveelheid lading die door de electrolysecel gaat wordt gemeten en direkt uitgedrukt in mg zuurstof. Voor de meting in grond is een hoeveelheid grond (op veldcapaciteit) ingewogen in kolven en is de zuurstofconsumptie gemeten onder aerobe condities bij 20°C. Zandmonsters gingen probleemloos maar bij klei werd de diffusie van zuurstof bemoeilijkt door het dichtslaan van de te kleine gronddeeltjes. De zuurstofconsumptie van de kleimonsters zijn dus weinig betrouwbaar. Het is waarschijnlijk dat de zuurstofconsumptie afhangt van de vochtigheid en de temperatuur van de monsters.

Alle zuurstofconsumpties dienen daarom met voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd. Voor de toekomst is het aan te bevelen enig onderzoek te verrichten naar de optimale omstandigheden waarmee de zuurstofconsumptie, bepaald met de Sapromat, kan worden gemeten. Alle resultaten zijn uitgedrukt per kg droge grond en zijn weergegeven in tabel 4.

Tabel 4. Glucose-eq., C.O.D., T.O.C., organisch stofgehalte en zuurstofconsumptie in verschillende grondsoorten

Soort grond	Glucose-equivalenten	C.O.D.	T.O.C.	Organische stof	Zuurstof consumptie
	mg/kg droge grond	mg O ₂ /kg droge grond	mg O ₂ /kg droge grond	%	mg O ₂ /kg droge grond/dag
1. Zandgrond (ondergrond)1	12	106	39	0,7	0,00
2. Zandgrond (ondergrond)2	20	166	69	1,5	0,68
3. Zandgrond (bovengrond)2	443	1402	376	4,6	9,24
4. Zandgrond (bovengrond)1	771	990	377	6,1	12,44
5. Zandgrond (siertuin)	713	2162	785	5,1	79,92
6. Sinderhoevezand	1635	3315	1080	7,4	54,52
7. Zavel	308	426	247	2,8	64,97
8. Löss	203	800	221	3,2	32,23
9. Winsumklei	142	626	148	3,5	56,94
10. Potgrond	3240	6280	2140	65,9	367,2
11. Veengrond	4920	11070	4230	75,9	niet bepaald (gebrek aan grond)

Ter verduidelijking is de hoeveelheid glucose-equivalenten bovendien uitgezet tegen de C.O.D., T.O.C., zuurstofconsumptie en organische stofgehalte (zie fig. 5 t/m 8).

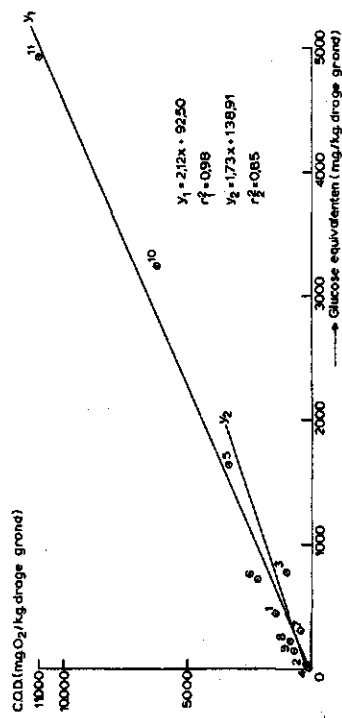


Fig. 5. Het verband tussen C.O.D. en glucose-equivalenten

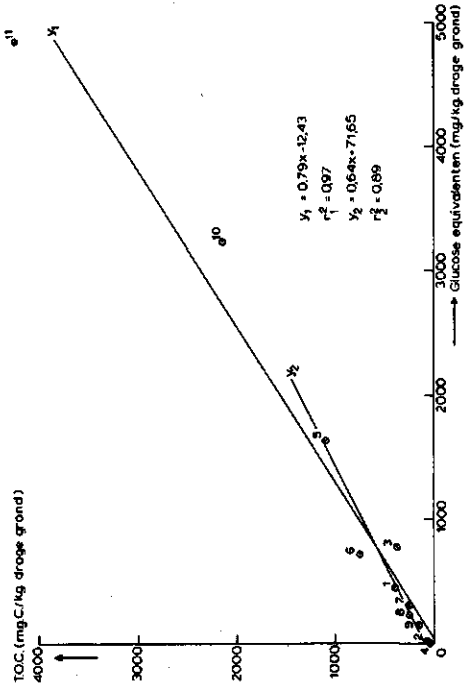


Fig. 6. Het verband tussen T.O.C. en glucose-equivalenten

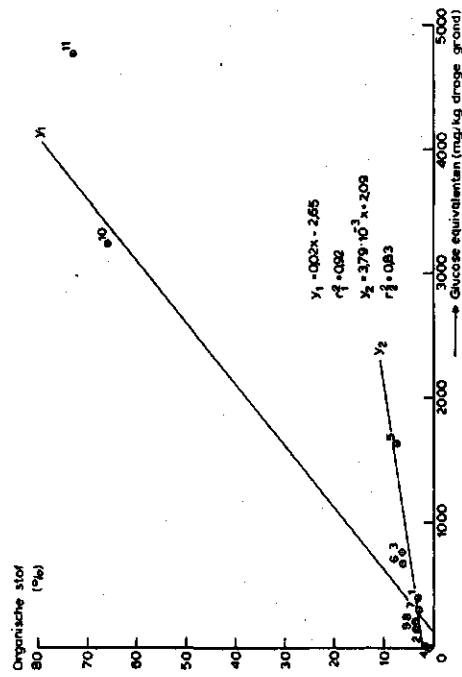


Fig. 7. Het verband tussen organische stof en glucose-equivalenten

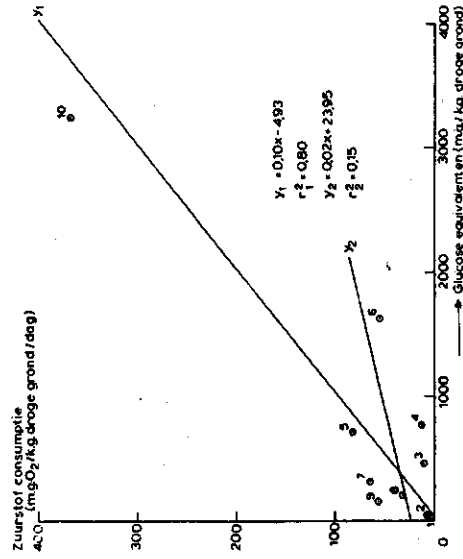


Fig. 8. Het verband tussen zuurstofconsumptie en glucose-equivalenten

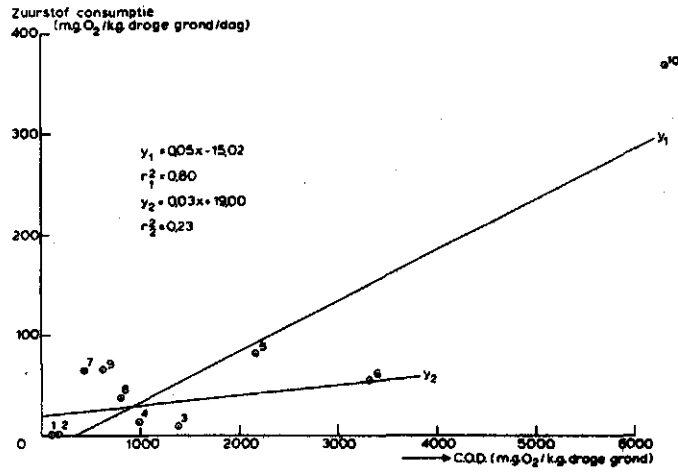


Fig. 9. Het verband tussen zuurstofconsumptie en C.O.D.

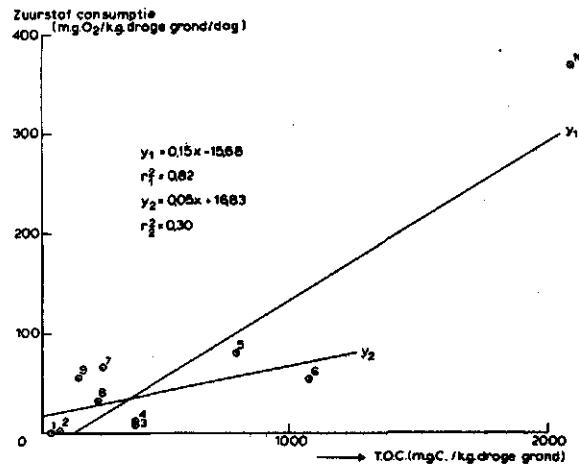


Fig. 10. Het verband tussen zuurstofconsumptie en T.O.C.

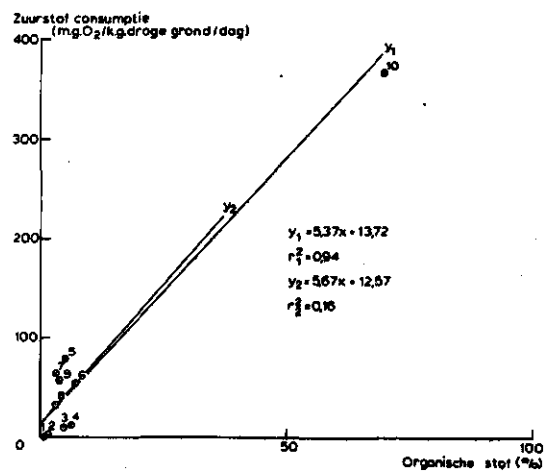


Fig. 11. Het verband tussen zuurstofconsumptie en organische stof

8

De ligging van de lijnen is berekend voor alle waarnemingen (x_1, y_1) met de methode der kleinste kwadraten. Bij de figuren is eveneens de bijbehorende correlatiecoëfficiënt r^2 , vermeld. Daar de functies grotendeels bepaald worden door de punten 10 en 11, zijn de lijnen nog eens berekend zonder deze waarnemingen (x_2, y_2, r_2^2).

Uit fig. 5 en 6 blijkt dat er een duidelijk rechtlijnig verband is tussen de hoeveelheid glucose-equivalenten en de T.O.C. en C.O.D. van de grondextracten. Tussen het organische stofgehalte en de glucose-equivalenten blijkt een matig verband te bestaan (fig. 8). Een recent uitgevoerde bemesting van grond kan het beeld extra verstoren, want het punt dat het meest afwijkt (punt 6: Sinderhoevezand) is grond van een recent bemest perceel. De glucose-equivalenten zijn door de bemesting meer toegenomen dan het organische stofgehalte.

Tevens is de zuurstofconsumptie vergeleken met de andere parameters voor de hoeveelheid direkt afbreekbare organische stof. Dit is weergegeven in fig. 7, 9, 10 en 11. Het verband tussen de zuurstofconsumptie en andere parameters is minder duidelijk, maar zou misschien kunnen worden verbeterd, zoals eerder genoemd, bij een optimale meetmethode van de zuurstofconsumptie.

6. SAMENVATTING EN CONCLUSIES

De denitrificatie in grond is afhankelijk van de hoeveelheid organische stof die beschikbaar is voor bacteriën

Een maat voor de direkt afbreekbare organische stof zijn de suikers welke kunnen worden bepaald met de anthronmethode. De grondmonsters worden hiertoe geëxtraheerd met 0,01 M calciumchloride. Water en vooral een natriumbicarbonaatoplossing zijn ongeschikt voor de extractie, omdat hiermee humuszuren worden meegeëxtraheerd. Een extractietijd van 3 uur blijkt te voldoen voor het reproduceerbaar extraheren van de suikers. In het extract zijn de suikers bepaald. Hiervoor is gebruik gemaakt van het reagens beschreven door GOLTERMAN (1970) (zie 3.2). Het reagens beschreven door JENHINSON (1963) blijkt minder goed te voldoen.

De optimale reactieomstandigheden zijn onderzocht. Een verwarmingsstijd van 20 minuten is voldoende. De kleur was van 20 tot 60 minuten na verwarmen maximaal. Het absorptiemaximum blijkt te liggen bij 630 nm. Calciumchloride en nitraat blijken invloed te hebben op de intensiteit van de ontwikkelde kleur. De storingen kunnen worden ondervangen door gebruik te maken van de standaard additie methode.

De resultaten verkregen met de anthromethode zijn vergeleken met de C.O.D. en T.O.C. in het extract en de zuurstofconsumptie en organische stofgehalte van de grond. Er blijkt een lineaire relatie te bestaan tussen de hoeveelheid suikers, bepaald met de anthromethode en de C.O.D. en T.O.C. van het extract.

De hoeveelheid glucose-equivalenten blijkt niet alleen af te hangen van de organische stof, maar wordt ook sterk beïnvloed door een recente bemesting. Direkte informatie over de denitrificatiecapaciteit van grond levert de zuurstofverbruikssnelheid. De resultaten van deze metingen zijn zowel vergeleken met die van de anthromethode als met de C.O.D., T.O.C. en het organisch stofgehalte. Het verband tussen de zuurstofconsumptie en deze andere parameters is niet betrouwbaar, maar zou misschien kunnen worden verbeterd bij een optimale meetmethode van de zuurstofconsumptie. Het effect van onder andere vochtgehalte van de grond op de zuurstofconsumptie zou in de toekomst moeten worden nagegaan.

7. LITERATUUR

- GIESEKING, JOHN E., 1975. Soil components, Volume 1. Organic components;
Sprinser-Verlag Berlin - Heidelberg - New York. 229-230
- BODEMVRUCHTBAARHEID, handleiding kandidaats-practicum, Landbouwhogeschool-Wageningen, laboratorium voor landbouwscheikunde, 1971
- GOLTERMAN, H.L., 1970. Methods for Chemical Analysis of Fresh Waters
75 Carbohydrates, 111-112
- HEY, VAN DER, D., P.K. PEELKAMP, 1966. Kennis van grond en bodem,
vierde druk J.R. Wolters, Groningen, §19 38-39 § 72 129
- JENKINSON, D.S., 1968. Chemical tests for potentially available
nitrogen in soil, J.Sci.Agr. 19, 160-168
- NEDERLANDS NORMALISATIE INSTITUUT, 1972. Methode voor analyse van
afvalwater NEN 3235
- SMITH, S.J. and G. STANFORD, 1971. Evaluation of a chemical index
of soil nitrogen availability. Soil Sci. 111, 228-232
- VARIANTECHNION, Analytical methods for flame spectroscopy

Zuivering anthron door herkristallisatie:

Meng 2 gram anthron met 25 ml benzeen/petroleumether 60-80°C (1:1) in een erlenmeyer van 300 ml met slijpstuk. Bevestig op de erlemeyer een koeler en verhit het mengsel langzaam op een kookplaatje tot koken. Voeg circa 0,5 g actieve kool toe voor ontkleuring. (De kleurstof wordt aan de kool geabsorbeerd en door middel van filtratie verwijderd). Bij gebruik van teveel kool kunnen aanzienlijke verliezen optreden van de te zuiveren stof.

Verwarm intussen een erlenmeyer, met daarin 5 ml van hetzelfde oplosmiddel en daarop een trechter met vouwfilter afgedekt met een horlogeglas, op het kookplaatje voor

Giet zodra anthron oplost en de oplossing kookt en de erlenmeyer + trechter goed warm zijn, de inhoud van de erlenmeyer snel op het filter. Verhit nog enige tijd. En breng met behulp van warm oplosmiddel de te snel gekristalliseerde stof ook nog over. Het is noodzakelijk dat al de actieve kool in het filter achterblijft. Laat de oplossing afkoelen. Er ontstaan kristallen. Filtreer deze kristallen af en was ze met koude benzeen/petroleumetheroplossing 60-80°C. Droog de kristallen. Bewaar de zuivere gele vaste stof in een afgesloten potje (in het donker).

Bereiding N-serve: N-serve = 2 chloro-6(trichloor methyl)-pyridine is een specifieke remmer van de nitrificatie, specifiekere dan athyl-thio ureum. Het blijft ook lang werkzaam, circa 100 dagen. Van N-serve afkomstig van 24 E van Dow Chemical te Terneuzen is het oplosmiddel afgedampt met behulp van rotatieverdamer bij $\pm 60^{\circ}\text{C}$ gedurende enkele uren. Het restant is overgebracht in water. De actieve stof kristalliseert uit in zeer fijne naaldjes; deze zijn afgefiltreerd en nagespoeld met water. Tijdens het afzuigen drogen de kristallen reeds. De actieve stof is gedroogd in een exicator.

N-serve heeft een oplosbaarheid van ± 20 mg/l bij kamertemperatuur. Er is gewerkt met een verzadigde N-serve oplossing die bereid werd door water gedurende enkele dagen te roeren in aanwezigheid van N-serve. (Het verdampt bij circa 160°C).