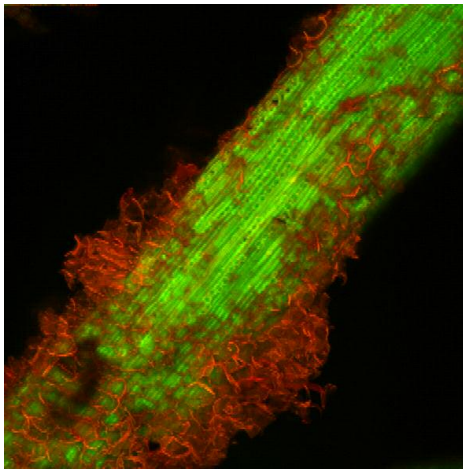


Eindrapportageonderzoek

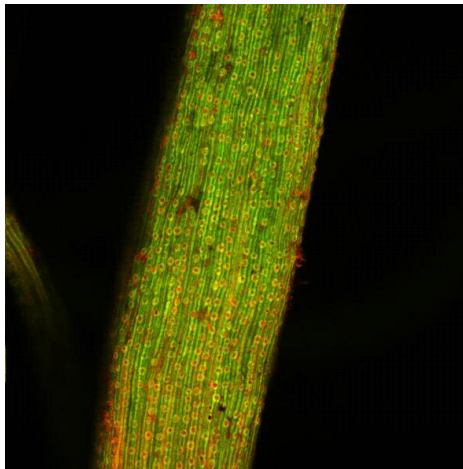
Ontwikkeling van een methode ter bepaling van de verouderingsstabiliteit van palmkokosvezelsengruis

(Projectnummer 11.279)

vers



oud



Eindrapportageonderzoek

**Ontwikkeling van een methode ter bepaling van de
verouderingen stabiliteit van palmkokosvezels gruis**

(Projectnummer 11.279)

Uitgevoerd door :

TNO Toegepaste Plantwetenschappen

Wassenaarseweg 64

2333 AL Leiden

&


Stichting RHP

Postbus 98

2670 AB Naaldwijk

Gefinancierd door :



Productschap  Tuinbouw

Productschap Tuinbouw

Postbus 280

2700 AG Zoetermeer

©TNO Toegepaste Plantwetenschappen Stichting RHP

Dit document is auteursrechtelijk beschermd. Niets uit deze uitgave mag derhalve worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch door fotokopieën, opnamen of openige andere wijze, zondervoorafgaande schriftelijke toestemming van TNO Toegepaste Plantwetenschappen en Stichting RHP.

TNO Toegepaste Plantwetenschappen en Stichting RHP zijn niet aansprakelijk voor schade bij toepassing of gebruik van gegevens uit deze uitgave, tenzij sprake is van opzet of grove schuld van de zijde van TNO Toegepaste Plantwetenschappen of Stichting RHP.

Inhoudsopgave

Pagina 4	-----	Samenvatting
Pagina 5	-----	Achtergrond en probleemstelling
Pagina 5	-----	Doelstellingenafbakening
Pagina 6	-----	Planvanaanpak
Pagina 11	-----	Resultaten
Pagina 21	-----	Tussenevaluatie
Pagina 22	-----	Vervolgmetingen
Pagina 29	-----	Conclusiesendiscussie
Pagina 30	-----	Aanbevelingen

1 Samenvatting

In dit rapport wordt verslag gedaan van gefaseerd onderzoek dat als doel heeft om een methode te ontwikkelen ter bepaling van de stabiliteit en ouderdom van palmkocos vezels en gruis. De resultaten die hier beschreven worden hebben betrekking op fase 1, het ontwerpen van een eenvoudig methode waarmee inzicht wordt verkregen in het verouderings stadium en de stabiliteit van kokosvezels (fase 1). In een vervolgprijs (fase 2) zal op basis van geselecteerde methoden de normwaarden voor de stabiliteit van kokosgruis en kokosvezel worden vastgesteld. Het onderzoek in fase 1 richt te zich op twee benaderingen om inzicht te krijgen over de ouderdom en stabiliteit van kokosmonsters. Het onderzoek is gebaseerd op de bepaling van de *microbiële activiteit* in kokosmonsters, terwijl een ander traject zich richt op de bestudering van de *vezelstructuur* als parameter om informatie te krijgen over de ouderdom en stabiliteit van kokosmonsters.

Om de *microbiële activiteit* te bepalen zijn drie methoden getoetst, te weten de NIOD methode, de Oxitop methode en een zelfverwarmingsmethode. Deze methoden zijn gebaseerd op het principe dat bij afbraak van organisch materiaal zuurstof wordt verbruikt, en dat hierbij warmte vrijkomt. Met zowel de **NIOD methode** als de **Oxitop methode** kan de zuurstofconsumptie van kokosmonsters worden bepaald. Zuurstofconsumptie geeft een afspiegeling van de microbiële activiteit van de monsters. Er werd een goede correlatie gevonden tussen de zuurstofconsumptie en de ouderdom van de monsters. Dit onderscheid is het best waartene men vanaf 30 uur na de start van de meting. Zuurstofconsumptiesnelheid van vers kokosgruis is circa 3 maal hoger dan van oud gruis onder de geconditioneerde condities. Ook **elfverwarming** is gecorreleerd aan de ouderdom van kokosmonsters. De methode kent echter een langer looptijd dan de NIOD Oxitop methode, en het onderscheiden d'ermogelijk is minder sterk.

Vezelstructuur werd bestudeerd met behulp van beeldanalyse, waarbij verschillende microscopische technieken zijn gebruikt. Met **CLSM** (Confocal Laser Scanning Microscopie) werd duidelijk dat parenchymweefsel (bevat voor al cellulose) wordt afgebroken naar mate een monster ouder is. Cellulose en lignine konden worden aangekleurd, maar de specificiteit van de kleuringsmethode moest nog worden geoptimaliseerd. Omdat te bereiken werd met "normale" lichtmicroscopie gewerkt. Ook dat gaf de structuurveranderingen weer tijdens het verouderingsproces; cellulose en lignine konden worden aangekleurd met respectievelijk fast green en safranine. Ook met behulp van een fluorescentie microscoop konden cellulose en lignine specifiek worden aangekleurd. Deze kleuringen waren zeer eenvoudig uit te voeren: cellulose kleurde aan met de kleurstof Calcofluor White, terwijl lignine door autofluorescentie al te detecteren was.

Op basis van de kleuringen die werden ontworpen om de fluorescentie microscopie is een **fluorescentiemeting** ontwikkeld, waarbij de ratio tussen Calcofluor White en lignine wordt bepaald. Calcofluor White kleurt specifiek cellulose aan, en daarom kan met de ratio informatie over de ouderdom van kokosmateriaal worden verkregen: hoe lager de ratio, des te verser het kokosmonster. Deze methode geeft aanvullende informatie op de zuurstofverbruiksmetingen (welke gebaseerd zijn op microbiële activiteit), omdat de methode informatie geeft over de vezelstructuur. Om dat de hoeveelheid lignine vrijwel constant is bij de verschillende monsters, kunnen fluorescentiemetingen daarnaast gebruikt worden voor de normalisering van afzonderlijke bepalingen.

Om de normwaarden voor de stabiliteit van kokosgruis en kokosvezel vast te stellen wordt aanbevolen om in fase 2 gebruik te maken van de NIOD methode, de Oxitop methode en fluorescentiemetingen.

2 Achtergrondenprobleemstelling

Kokosvezels, afkomstig uit o.m. India, zijn een interessante natuurlijke grondstof voor substraatproductie. De vezels komen vrij bij de winning van kokos, na scheiding van de notenbast. De vezelrijke bast wordt opgeslagen (2-3 maanden) zodat de verteerbare componenten, g.v. microbiologische activiteit worden omgezet. Hierna wordt de bast fractie vermalen en wordt een verzadigingsbehandeling toegepast, waarna vezel en gruis worden gescheiden. De vezel wordt na bewerking verscheept naar Nederland; het gruis wordt eerst nog 6 maanden opgeslagen en vervolgens verwerkt tot substraat. In Nederland worden materialen slechts kortetijd opgeslagen, waarna eindproducten worden gefabriceerd voor de tuinbouw. De begrippen stabiliteit en ouderdom worden vaak door elkaar gebruikt. Destabiliteit van kokos geeft aan in hoeverre het organisch materiaal is afgebroken. Een belangrijk kenmerk betreffende stabiliteit is de microbiële activiteit in de materie, die ervoor zorgt dat de snel verteerbare fractie verdwijnt. Dit is gerelateerd aan de ouderdom van het materiaal. Destabiliteit van kokosgruis en kokosvezel is van groot belang voor de kwaliteit van het geproduceerde substraat, onder meer vanwege de fysische structuur van stabiel materiaal, chemische veranderingen (bijv. stikstof-fixatie) en uiteraard de plantengroei. In een relatief stabiele vezel fractie vindt de veroudering - en tuinbouwtoepassingen acceptabel langzaam verouderingsproces plaats. Het verouderingsstadium, en daarmee de mate van stabiliteit, van kokosvezels wordt op dit moment veelal bepaald m.v.v. van chemische parameters. Met deze methoden is het verouderingsstadium van de vezels niet goed te bepalen. Instabiele producten kunnen leiden tot problemen in de teelt van tuinbouwgewassen.

3 Doelstellingenafbakening

De doelstelling van dit project is het ontwerpen van een eenvoudige methode waarmee een beter inzicht wordt verkregen in het verouderingsstadium en de stabiliteit van kokosvezels (fase 1). In een vervolproject (fase 2) zullen op basis van een ontwikkelde methode de normwaarden voor destabiliteit van kokosgruis en kokosvezel worden vastgesteld.

4 Plan van aanpak

In dit project (fase 1) worden een aantal methoden getoetst op hun bruikbaarheid om inzicht te krijgen in het verouderingsstadium en stabiliteit van kokosvezels en gruis. De methode is gebaseerd op de bepaling van microbiële activiteiten en microscopische structuur in verschillende kokosmonsters. Metingen zullen worden uitgevoerd aan de hand van een aantal representatieve vezel- en gruismonsters van enkele verschillende stadij tijdens de bewaring. TNO en RHP zullen het onderzoek richten op de volgende aspecten:

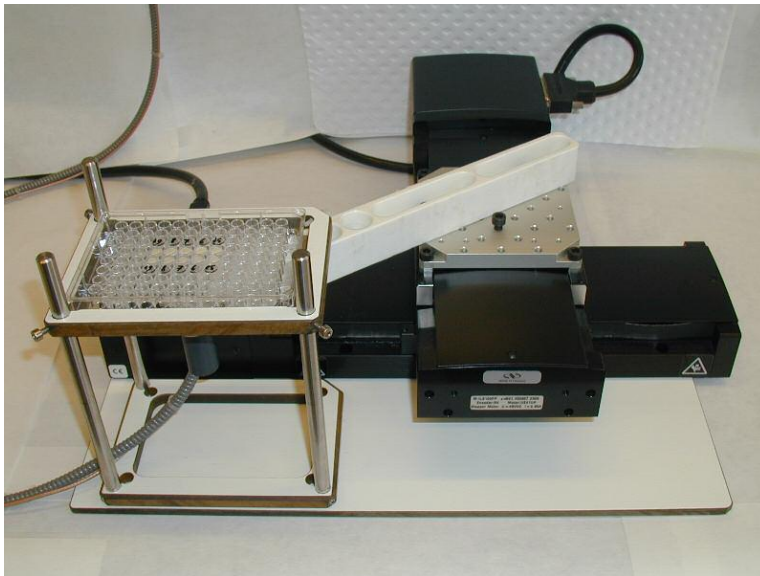
4.1 Microbiële activiteit

Het is aannemelijk dat de microbiologische activiteit in het vezel materiaal gerelateerd is aan de ouderdom van het materiaal. De opslagcondities van het materiaal en de positie in het opgeslagen materiaal (i.v.m. aanwezigheid van zuurstof, vochtgehalte en warmteontwikkeling) zullen de kinetiek van deze activiteit in hoge mate beïnvloeden. Geleidelijk zal de afbraak snelheid echter afnemen en zal een relatief stabiel, vezelrijk eindproduct ontstaan. Voor de vaststelling van zuurstof consumptie als indicator voor microbiële activiteit worden een aantal methoden beproefd.

4.1.1 Zuurstof consumptie meting met non-invasieve fluorescentie (NIOD)

Taakhouder: TNO

De zuurstof consumptie van monsters is hoogstwaarschijnlijk een goed maat voor de microbiologische activiteit. TNO-TPW heeft expertise en faciliteiten om geautomatiseerd een non-invasieve en gesloten ruimte de zuurstofgehalte te meten (NIOD methode).



Figuur 1: de NIOD meetopstelling

De NIOD methode is gebaseerd op een optische methode voor het meten van zuurstof in verpakkingen. De methode is ontwikkeld door de afdeling Sensor Technologie van TNO Voeding. Het principe voor deze sensor is gebaseerd op de beïnvloeding van de optische eigenschappen van een zuurstofgevoelige coating. De optische eigenschappen van de zuurstof

gevoelige coating kunnen met behulp van speciale elektronica worden vertaald naar een zuurstofconcentratie.

Voor het contact loos meten van zuurstof in een afgesloten ruimte wordt een klein stukje kunststof, voorzien van een zuurstofgevoelige coating, ingesloten in een meetkamer. Voorwaarde is wel dat het de meetkamer een klein beetje licht doorlatend is. De zuurstofconcentratie in de meetkamer kan nu zo vaak als gewenst gemeten worden, zonder de meetkamer te openen. Dit is mogelijk omdat de sensor, in tegenstelling tot de meeste andere zuurstofsenoren, zelf geen zuurstof verbruikt.

In *Figuur 1* is de NIOD opstelling afgebeeld. Een robotarm scan periodiek de zuurstofgehalten in een meetkamer. Dat kan een cel zijn in een 96-wellsplaat, zoals op de foto, maar ook grotere objecten b.v. flesjes met een variabel volume. Groot voordeel van de NIOD methode is dat de methode geautomatiseerd is (de robotarm scan automatisch het sample), de methode is eenvoudig uit te voeren, en de zuurstofbepalingen zijn makkelijk op te schalen. Inmiddels is er bij TNO Voedingruime ervaring opgedaan met het in de tijd meten van zuurstofgehalten in allerlei producten, bijvoorbeeld kiemende zaden, en verder in allerlei andere toepassingen zoals bierflessen, vers spaghettisalades.

Enkele andere voordelen van de methode zijn:

- Meten zonder de meetkamer te openen
- Snelle meting, ca. 10 seconden per meet sessie
- Lage detectie grenzen tot 0.04 vol% in lucht mogelijk
- Geen invloed van de pH tussen pH=2 tot pH=12 of zout concentraties
- Geen invloed van andere gassen die aanwezig zijn in de meetkamer

In een serie experimenten werd de bruikbaarheid van de NIOD methode bepaald worden om zuurstof consumptie te bepalen. De invloed van de volgende variabelen op zuurstof consumptie werd onderzocht:

- vochtgehalte;
- monstervolume;
- meetkamervolume;
- tijdsduur van de meting;
- temperatuur;

4.1.2 Zuurstofconsumptiemeting met de Oxitopmethode

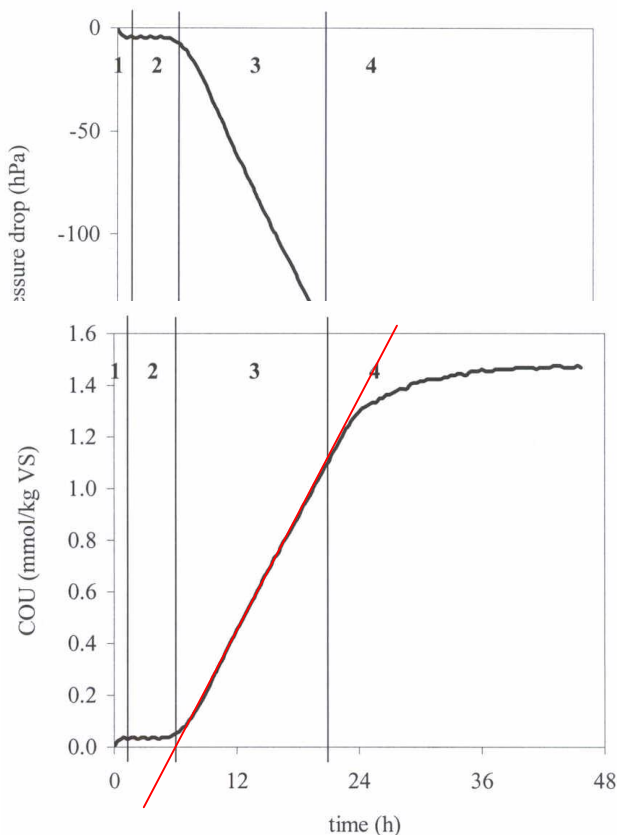
Taakhouder: RHP

De Oxitopmethode is internationaal sterkinopmars voor het bepalen van de mate waarin materialen aantastbaar zijn voor micro-organismen. In de compostindustrie zal deze methode in de toekomst de standaardmethode worden voor bepaling van de stabiliteit (rijpheid) van gecomposteerde materialen. De methode is eenvoudig uit te voeren en geeft een direct beeld van de mate van microbiologische activiteit. De Stichting RHP zal in een serie experimenten het onderscheidend vermogen van de methode voor kokosproducten toetsen.

Figuur 2: de Oxitop meetopstelling



In de Oxitopmethode wordt in een suspensie onder gestandaardiseerde condities (temperatuur, pH, zuurstof, nutriënten en vochtigheid) de snelheid van zuurstofconsumptie (of respiratiesnelheid) van het te onderzoeken materiaal bepaald. Materialen worden geïncubeerd bij 30 °C in een gesloten fles met daarop een drukopnemer. Bij optredende aërobie afbraak wordt zuurstof geconsumeerd en ontstaat koolstofdioxide. De ontstane koolstofdioxide wordt afgevangen middels NaOH korrels welke zich boven in de fles bevinden. Hierdoor ontstaat een onderdruk in de fles. De mate van onderdruk, ofwel het verschil in druk, is maatgevend voor de zuurstofconsumptie. Na inzet vindt de vastlegging van meetgegevens plaats door de drukopnemer welke elektronisch wordt uitgelezen. De test is relatief eenvoudig uit te voeren. De methode is ontwikkeld voor het testen van afvalwateren compost.



In het proces dat ontstaat in de fles zijn vier fasen te onderscheiden (zie figuur 3). In fase 1 is het effect van temperaturen en waterverzadiging op de luchtdruk zichtbaar. Fase 2 is de zogenaamde “lag fase”. Hierin vindt adaptatie en de groei van micro-organismen populatie plaats. Deze kan worden bekort door enting. In fase 3 vindt drukval voor respiratie plaats. In fase 4 raakt de zuurstof in de gasfase op waardoor de respiratie wordt geremd en uiteindelijk stopt. In fase 3 wordt de cumulatieve zuurstofopname vastgesteld. Aan de hand van de vastgestelde drukval en de analyse genomen hoeveelheid organisch stof (OS) wordt de COU (Cumulative Oxygen Uptake) berekend.

Figuur 3: Cumulatieve zuurstofopname bij aërobie afbraak van organisch materiaal, waarbij 4 verschillende fasen kunnen worden onderscheiden.

Vervolgens kan hieruit ook een respiratiesnelheid (OUR) worden bepaald. Deze snelheid wordt berekend middels de volgende formules:

$$COU = \frac{\Delta P}{83.14 \cdot (273.15 + T) \cdot W \cdot DS \cdot OS} \cdot V_{\text{gas}}$$

hierin zijn ΔP de drukdaling van de gasfase (mbar of hPa), T de temperatuur van de meting ($^{\circ}\text{C}$), V_{gas} het volume van de gasfase (ml), W het gewicht van het monster (kg), DS het drogestofgehalte van het monster ($\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1}$) en OS het organischestofgehalte van het monster ($\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot DS$). Het volume van de gasfase wordt daar bij berekend aan de hand van de exacte inhoud van de fles en de hoeveelheid vocht, organische stoffen, minerale delen in de testsituatie.

$$OUR = \frac{COU(\Delta t)}{\Delta t}$$

De respiratiesnelheid (OUR) van het monster (in $\text{O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{OS} \cdot \text{uur}^{-1}$) wordt bepaald uit de helling van de COU in de lineaire periode 3 (zie voorgaande figuur)

Volgende tabel geeft een inzicht in waarden gemeten voor organisch materiaal in diverse stadia.

Tabel 1: respiratiesnelheden van compost in diverse stadia ($\text{mmol O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{OS} \cdot \text{uur}^{-1}$)

Ongecomposteerde vers organisch materiaal	>50
Vers compost	5- 10
5 maand engerijpte compost	3- 5
Zeer stabiel materiaal	<1

Onderzoek uitgevoerd met compost door de sectie milieutechnologie van de WUR heeft aangetoond dat respiratie optimaal en homogener verloopt indien organisch materiaal worden geïncubeerd in een slurrie-oplossing met toevoeging van pH buffer, nutriënten, en materiaal en nitrificatieremmer. Hierbij werd geconcludeerd dat in geval van incubatie in vaste vorm zuurstof niet geheel doordringt in betreffend monster waardoor slechts een klein deel van het monster blootstaat aan anaëroefbraak. De mate van zuurstof penetratie is daarbij sterk afhankelijk van onder andere de porositeit, vochtigheid en pakking van het monster. Respiratie in vaste vorm is goed reproduceerbaar omdat gezorgd wordt voor goede gecontroleerde omstandigheden; geen massatransport limitaties (er is goed contact tussen micro-organismen en organisch stof) en optimale omstandigheden door toevoeging van nutriënten, pH buffer en een microbiële populatie.

De methode is als dusdanig geïmplementeerd in het uitgeoefende onderzoek naar de aantastbaarheid van kokosmaterialen. Hierbij is met name gekeken naar de hoeveelheid in analyse genomen materiaal. Dit is wezenlijk anders dan bij compost, wat met name in de eerste fase van het compostingsproces zeer afbraakgevoelig is. Kokosmaterialen hebben daarentegen enige stabiliteit. Dit houdt in dat om voldoende onderscheid te kunnen creëren tussen vers en verouderd

kokosgruis/vezelmeer materiaal in analyse die entte worden genomen in verhouding met het meetvolume.

4.1.3 Zelfverwarming

Taakhouder: TNO

Bij incubatie van organisch materiaal in een afgesloten vaatje zal de temperatuur toenemen als gevolg van vnl. microbiologische activiteit. Deze zelfverwarming is waarschijnlijk een een parameter die een indruk geeft van de ouderdom van het monster. In compost onderzoek is dit een gangbare methode voor stabiliteitsbepaling.

Voor deelten opzicht van zuurstofmetingen kan zijndat ook activiteit van anaërobie microorganismen in de zetst tot uitdrukking komen. In hoe verre deze microorganismen bij kokosveroudering een rol spelen zal worden getest door de resultaten van de verschillende meetmethoden naast elkaar te leggen.

Enkele variabelen die getoetst worden zijn:

- incubatieduur;
- monstergrootte;
- vochtgehalte;
- begintemperatuur;

4.2 Vezelstructuur

Taakhouders TNO en RHP

Met behulp van Confocal Laser Scanning Microscopie (CLSM) werd de structuur van kokosvezels en gruis non-destructief bestudeerd en een 3D beeld van de monsters samengesteld. Door onderzoek aan monsters van verschillende leeftijden werdinzage verkregen in de structurele verandering die optreden. Met behulp van CLSM en lichtmicroscopie en fluorescentie spectrometrie is ook de verhouding lignine en cellulose in verschillende monsters bepaald.

4.3 Materialen

In dit project zijn twee maal een aantal monsters onderzocht. De eerste serie monsters bestond uit:

1. Ruwgruis
2. Oud kokosgruis extra gezeefd
3. Voorbeeldchips
4. Afzeefselchips vers
5. Voorbeeldvezel

Monsters 1 en 2 zijn vergelijkbaar, en verschillen in een extra zeefstap. Dat zelfde geldt voor monsters 3 en 4; deze monsters zijn vers en de overige. Monster 5 heeft een afwijkende oorsprong.

Na afloop van de eerste analyses heeft een evaluatie plaatsgevonden (hoofdstuk 6), en vervolgens is een tweede serie monsters onderzocht. Deze monsters waren beter gedefinieerd ten aanzien van ouderdom:

1. Kokosgruis: 2-3 jaar oud
2. Kokosvezel: oud
3. Kokosgruis: 2 maand en oud
4. Kokosgruis: 6 maanden oud
5. Kokosgruis: zeervers
6. Kokosvezel: zeervers

Demonsters werden aangeleverd met een vochtgehalte van ca. 15%. Ten behoeve van de NIOD, Oxitopen zelfverwarming methoden werden de monsters voorafgaand aan analyse op een watergehalte van 80% gebracht.

5 Resultaten

Eersteseriemetingen :

Om de bruikbaarheid van een aantal methoden te onderzoeken om de ouderdom van kokosgruis en vezel te bepalen, is in eerste instantie gebruik gemaakt van vijf kokosmonsters en een aantal houtmonsters. Een aantal methodes zijn gebaseerd op de microbiële activiteit, terwijl één methode focus teop de vezelstructuur (zie ook plan van aanpak).

5.1 Zuurstofconsumptiemeting door middel van NIOD

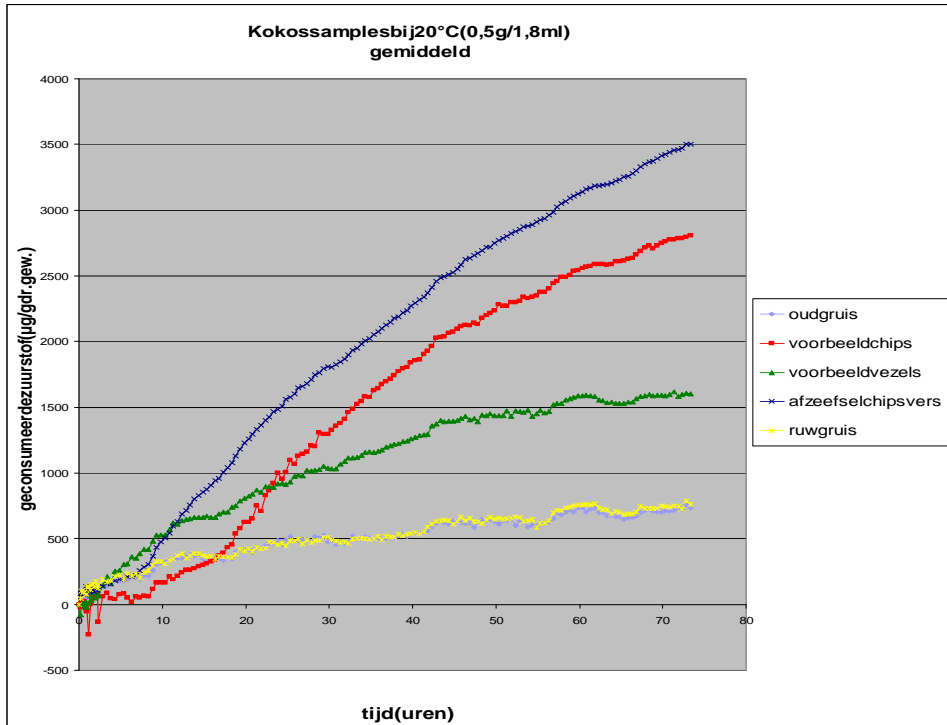
Bij de NIOD methode wordt het zuurstofverbruik gemeten met behulp van een optische methode. In een sample flesje wordt tenaef gemeten hoeveelheid kokosmateriaal gedaan. Het flesje wordt vervolgens gesloten. De NIOD methode is in staat om vervolgens door het glas heen de zuurstofconcentratie in het flesje te bepalen. In de tijd zal het kokosmateriaal zuurstof verbruiken. Het uitgangspunt is dat de mate van consumptie een indicatie is voor de ouderdom van het materiaal. Om de decompositie reactie te testen werd voor deze methode alleen water aan het sample toegevoegd (tot een vochtgehalte van 80%), en verder geen nutriënten. Ook wordt niet aangeënt met extra micro-organismen om de reactie te starten.

Tijdens de meting zijn de volgende parameters gevarieerd:

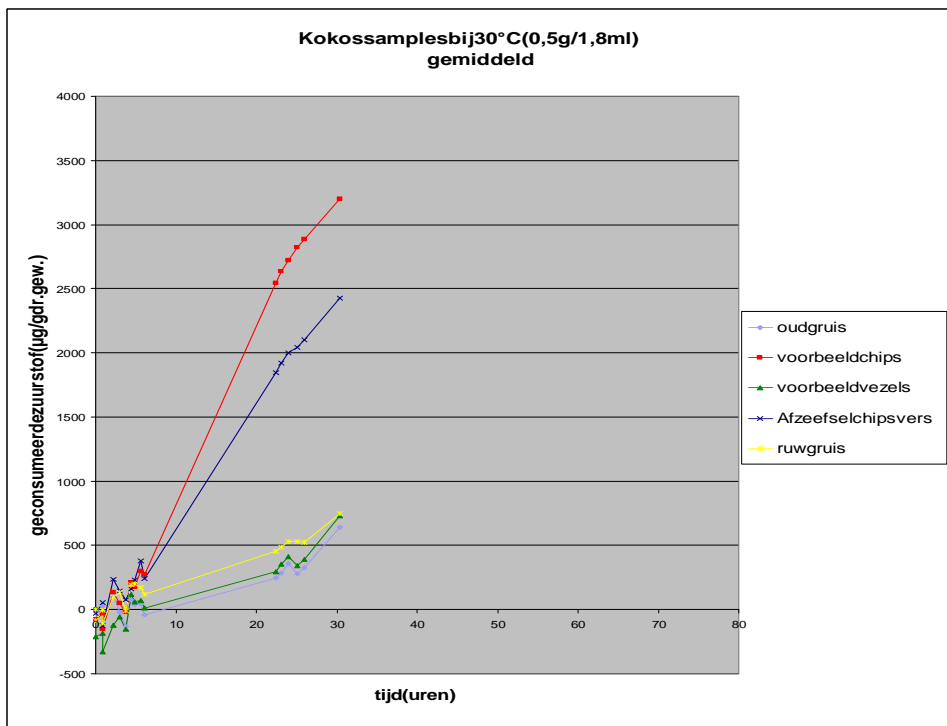
- het meetkamer volume: eerst 1.8 mL en daarna 0.2 mL (in 96 wells platen)
- incubatietemperatuur: 20°C en 30°C.
- hoeveelheid kokosmateriaal per meetkamer volume.

De experimenten met de NIOD methode geven het volgende aan (zie Figuur 3-8):

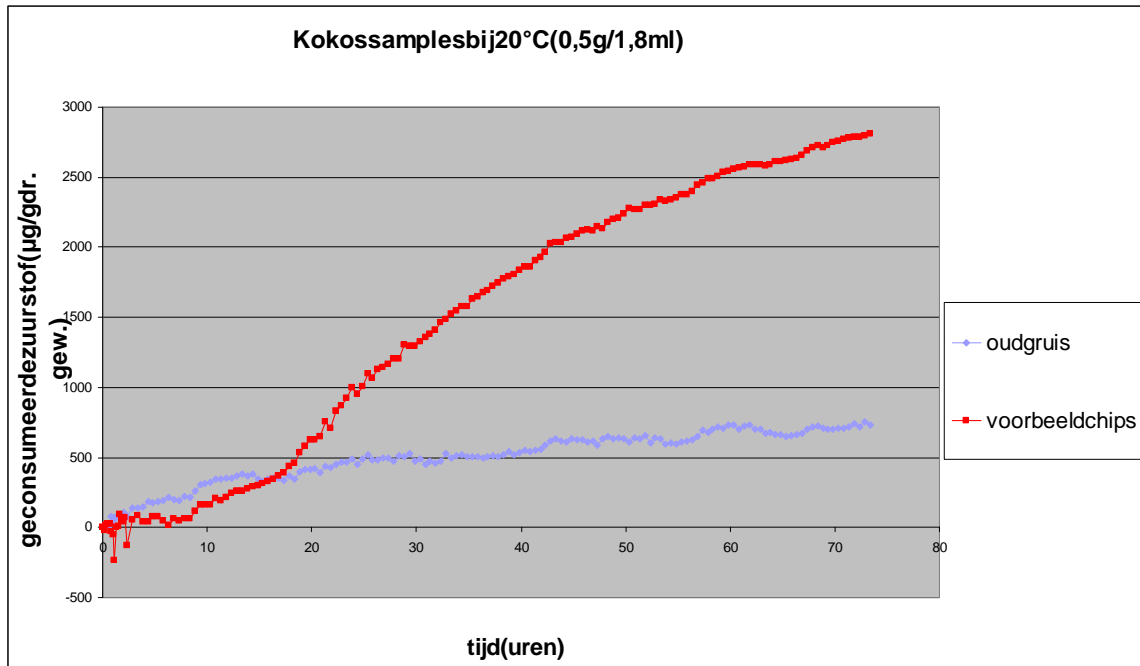
- met de NIOD methode is zuurstofconsumptie goed te meten.
- De methode is zeer eenvoudig uitvoerbaar
- De zuurstofconsumptiesnelheid is afhankelijk van de incubatietemperatuur (vergelijk Figuur 4 en 5) en de hoeveelheid materiaal in de meetkamer (vergelijk Figuur 6 en 7). Verhoging van de temperatuur van 20°C naar 30°C versnelt de zuurstofconsumptie met een factor twee.
- Daarnaast blijkt de zuurstofconsumptiesnelheid sterk te hangen van de ouderdom van het materiaal: voorbeeld chips en afzeefselchips (beide relatief verse monsters) gaven aanmerkelijk hogere zuurstofconsumptiesnelheden dan de overige monsters.
- De NIOD methode kon al binnen 1 dag onderscheid maken tussen beide gruismonsters en voorbeeld vezel enerzijds, en beide chipsmonsters anderzijds.



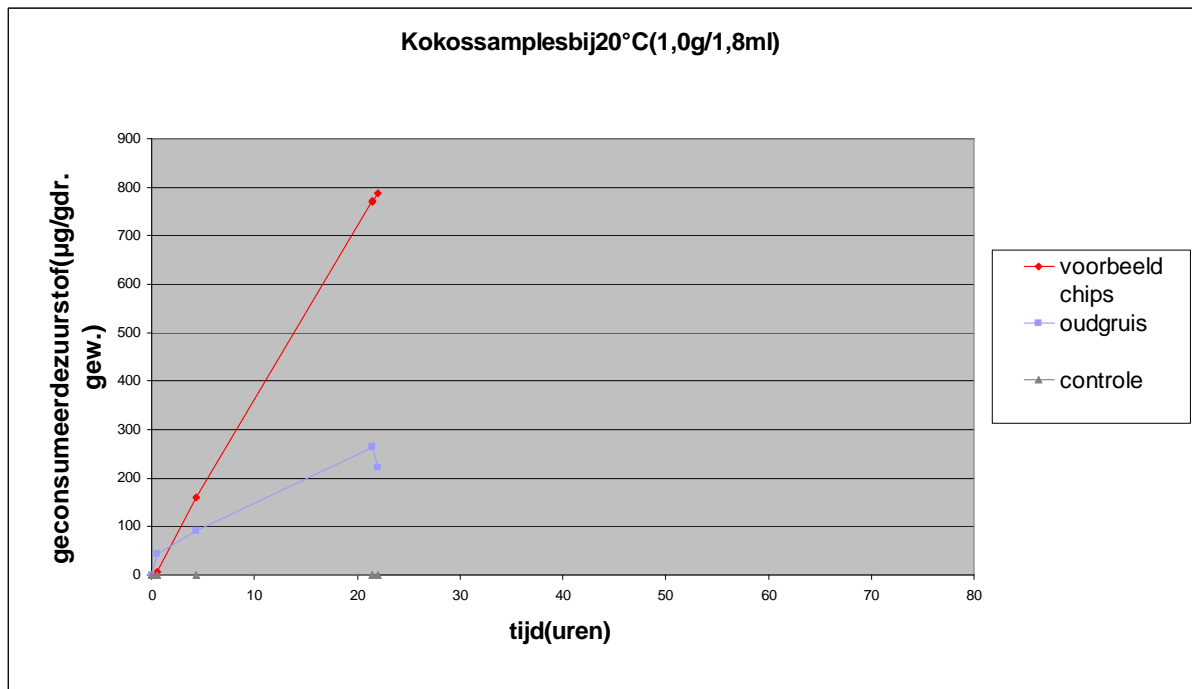
Figuur 4: zuurstofverbruik van vijf verschillende kokossamples bij 20°C. Zuurstofverbruik is uitgedrukt als totaalverbruik in µg/g drogestof.



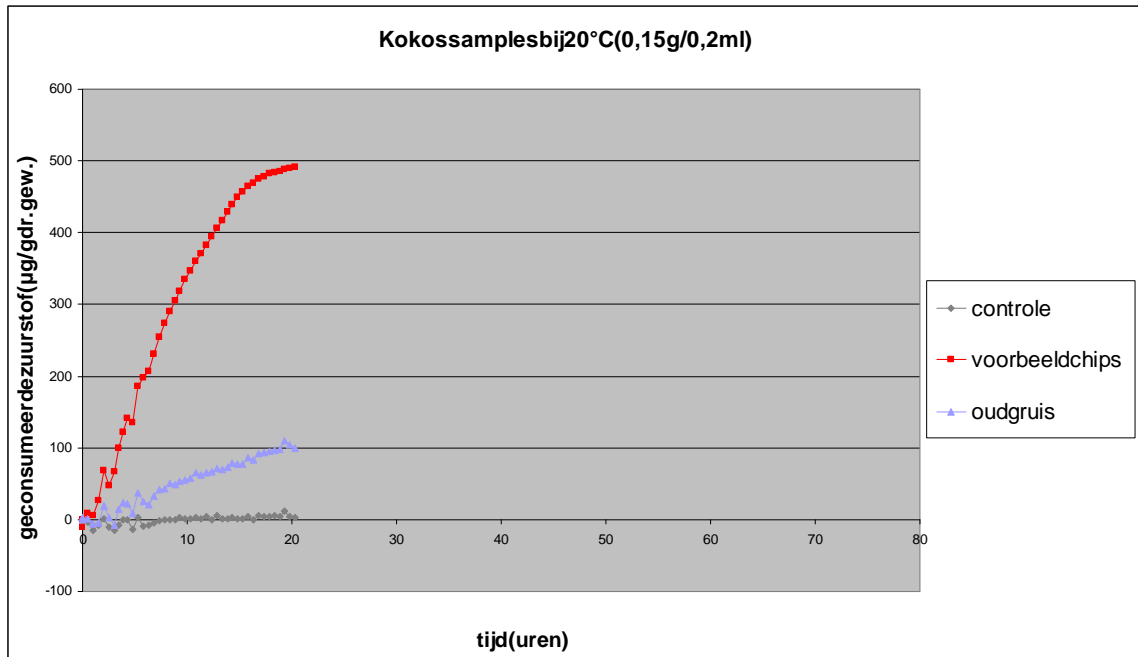
Figuur 5: zuurstofverbruik van vijf verschillende kokossamples bij 30°C. Zuurstofverbruik is uitgedrukt als totaalverbruik in µg/g drogestof.



Figuur 6: zuurstofverbruik van twee kokosmonsters bij 20°C. Zuurstofverbruik is uitgedrukt als totaalverbruik in µg/g drogestof.



Figuur 7: zuurstofverbruik van twee kokosmonsters bij 20°C. Bij de controle is geen kokosmateriaal, maar alleen water in een meetkamer toegevoegd. Zuurstofverbruik is uitgedrukt als totaalverbruik in µg/g drogestof.



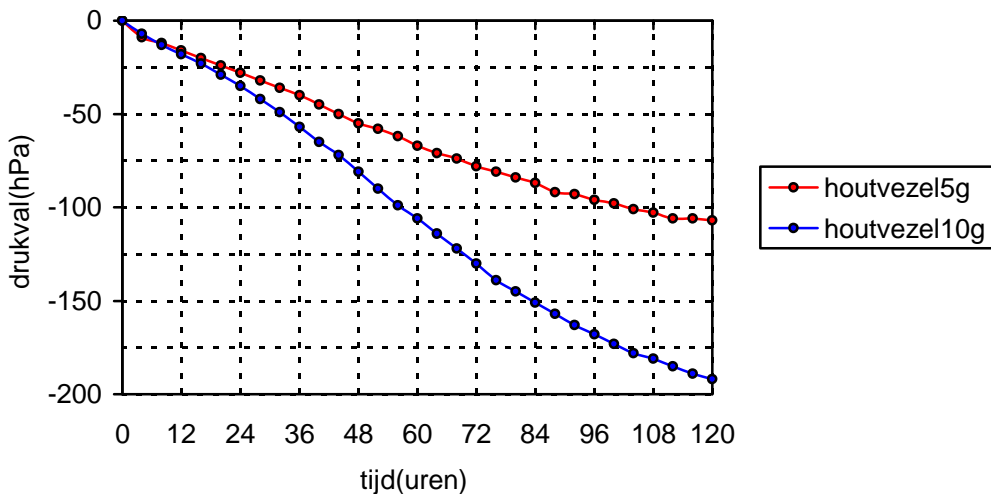
Figuur 8: zuurstofverbruik van twee verschillende kokossamples bij 20°C. Bij de controle is geen kokosmateriaal, maar alleen water in een meetkamer toegevoegd. Zuurstofverbruik is uitgedrukt als totaalverbruik in µg/g drogestof.

5.2 Zuurstofconsumptiemetingdoormiddelvan de Oxitop methode

In de eerste metingen werd de methode beproefd met houtvezel. Van dit materiaal is bekend dat het gemakkelijk door micro-organismen kan worden aangetast. Er werden een aantal doseringen drogestof in incubatie genomen waarbij eerst in een instantiekennis gemaakt werd met de methodiek en de kritische omgevingsfactoren. Met name de beheersing van de temperatuur bleek cruciaal. De halve vond de incubatie plaats in een incubator die een temperatuur van $30 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ kon handhaven gedurende de test. De beschreven pH-buffer bleek konvoldoende te zijn om de pH te handhaven. Te aanvulling hierop werd kalk toegevoegd aan de slurrie.

De hoeveelheid water werd uiteindelijk vastgesteld op 450 ml bij een dosering van 20 gram drogestof in een fles met een inhoud van 1 liter.

Een eerste doseringsvergelijking vond plaats met 5 en 10 gram houtvezel. Deze doseringen zijn gebaseerd op de ervaring met compost waar 5 gram drogestof in een analyse wordt genomen. Figuur 9 geeft de mate van drukval weer die werd waargenomen in de test voor genoemde doseringen.



Figuur 9 - Drukval bij houtvezel (5 en 10g) in Oxitop methode

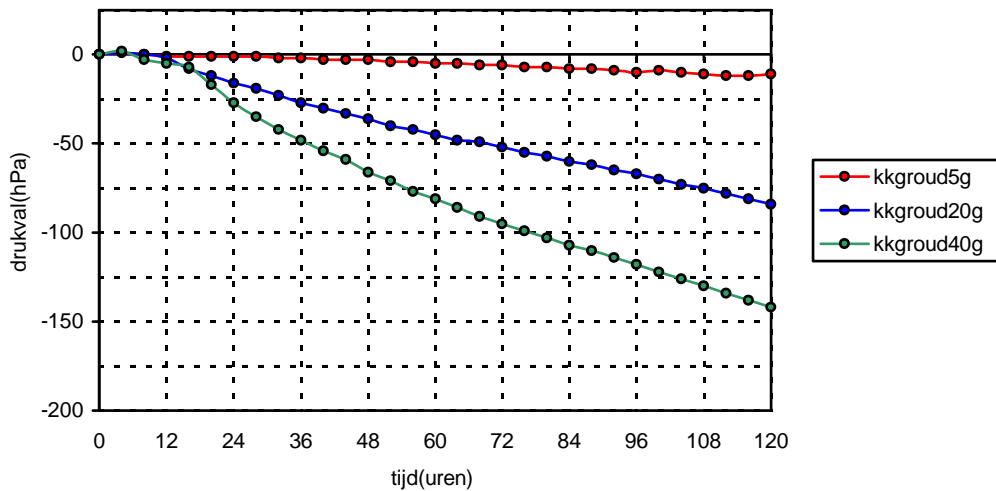
Bij de lage dosering van 5 gram kwam de karakteristieke curve zoals beschreven niet naar voren. Het is dan moeilijk om het lineaire gedeelte (fase 3) goed aantekunnen te duiden. Daar waar 5 gram wel voldoet voor compost, voldeed het niet voor houtvezel. Bij een dosering van 10 gram kwam wel enigszins de karakteristieke vorm naar voren. Hierbij kon fase 3 worden onderscheiden in de periode van 28 - 72 uur. Daarna zette een afvlakking van de curve in.

Tabel 2 - Δt en bijbehorende respiratiesnelheid voor twee doseringen houtvezel.

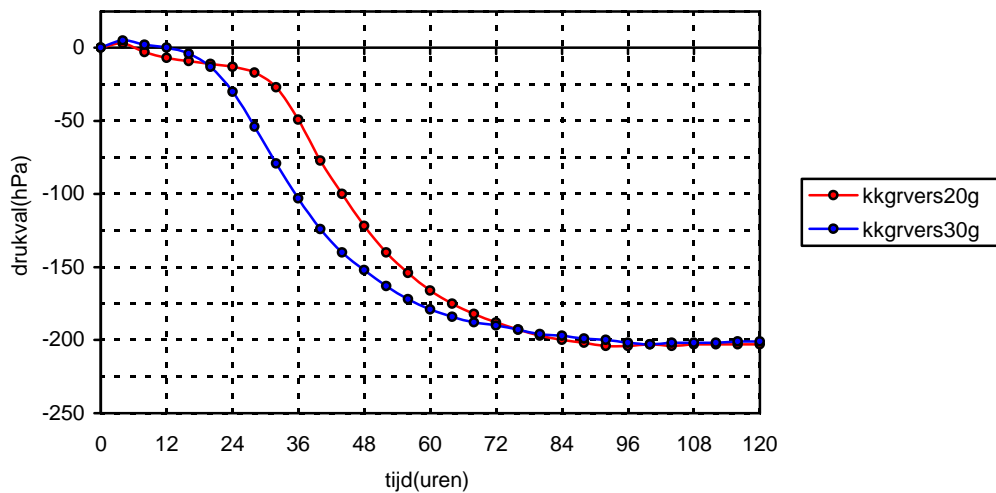
	Δt	Respiratiesnelheid
5g houtvezel in de test	24- 72 uur = 48 uur	$8,1 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{OS} \cdot \text{uur}^{-1}$
10g houtvezel in de test	28- 72 uur = 44 uur	$7,8 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{OS} \cdot \text{uur}^{-1}$

Hoewel de bepaalde respiratiesnelheden voor beide doseringen vergelijkbaar met elkaar zijn kan toch worden gesteld dat het lineaire gebied betrouwbaarder kon worden vastgesteld bij de hoogste dosering. Derhalve verdient deze de voorkeur boven de lage dosering.

Op grond hiervan werd geconcludeerd dat een minimale hoeveelheid toetsmateriaal voor het verkrijgen van een goede afleesbare curve rond 20 gram moest liggen. Op grond hiervan werden aantal doseringen gezet met een totaal kokosmonsters, gedefinieerd als oud kokosgruis (kkgr oud) en vers kokosgruis (kkgr vers), respectievelijk monsters 2 uit de eerste reeks monsters, en monster 5 uit de tweede reeks monsters. De drukval karakteristiek zijn weergegeven in de figuren 10 en 11.



Figuur 10 -Drukval bij oud kokosgruis (5, 20 en 40g) in Oxitop methode



Figuur 11 -Drukval bij vers kokosgruis (20 en 30g) in Oxitop methode.

Aandehand van het monster kokosgruis kan worden geconcludeerd dat een dosering van 20 gram voldoet om een goed registreerbare fase 3 in de drukval te creëren. Een hogere dosering heeft geen meerwaarde. Dit wordt duidelijk uit de gelijkere respiratiesnelheid. Het monster kokogruis geeft ook bij 20 gram een betrouwbaar vaststellen van de respiratiesnelheid. Een hogere dosering geeft ook daar bij geen meerwaarde.

Tabel 3 - Respiratiesnelheid voor oud kokosgruis en vers kokosgruis bij diverse doseringen in de test.

	Respiratiesnelheid (mmol O ₂ · kg ⁻¹ · OS · uur ⁻¹)
5g kokogruis	0,6
20g kokogruis	1,4
40g kokogruis	1,4
20g kokogruis vers	8,3
30g kokogruis vers	8,3

5.3 Zelfverwarming

De zelfverwarmingmethode werd gebruikt op goed geïsoleerde, vaatjes. In eerste instantie werd de bevochtigde monsters zonder verdere toevoeging geïncubeerd. Het bleek dat de toename in temperatuur gemeten kon worden, hetgeen wijst op een beperkte afbraak van het organisch materiaal.

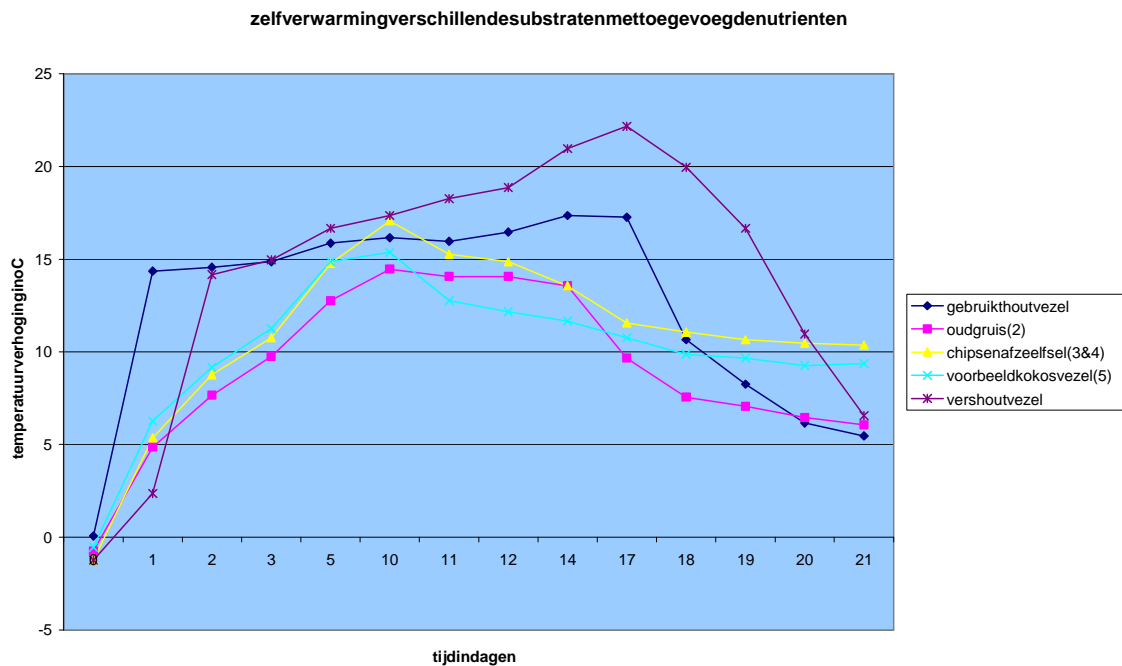
Om de afbraak van het kokosmateriaal dusdanig te catalyseren dat een temperatuurtoename gemeten kon worden, zijn daarom nutriënten toegevoegd. Per 100 gram kokosmateriaal werd daarom toegevoegd:

- 1,7 g zetmeel
- 1,7 g glucose
- 4,2 g pectine
- 4,3 g pepton

Als positieve controle zijn ook een aantal houtmonsters meegenomen, waarvan bekend is dat ze beslist zelfverwarming moeten geven.

De resultaten zijn weergegeven in Figuur 12.D en conclusies na aanleiding van de eerste zelfverwarming experimenten zijn:

- zowel de houtmonsters als de kokos samples geven een temperatuurtoename te zien in de tijd
- De test gaven aan dat bij de kokos samples de temperatuur toename langzamer plaats vond dan bij de hout samples; uiteindelijk (na 10 dagen) was de toename echter vergelijkbaar.
- Opvallend is dat er in deze (eerste) tests weinig verschil was waartussen in de temperatuurtoename tussen de verschillende kokos samples.



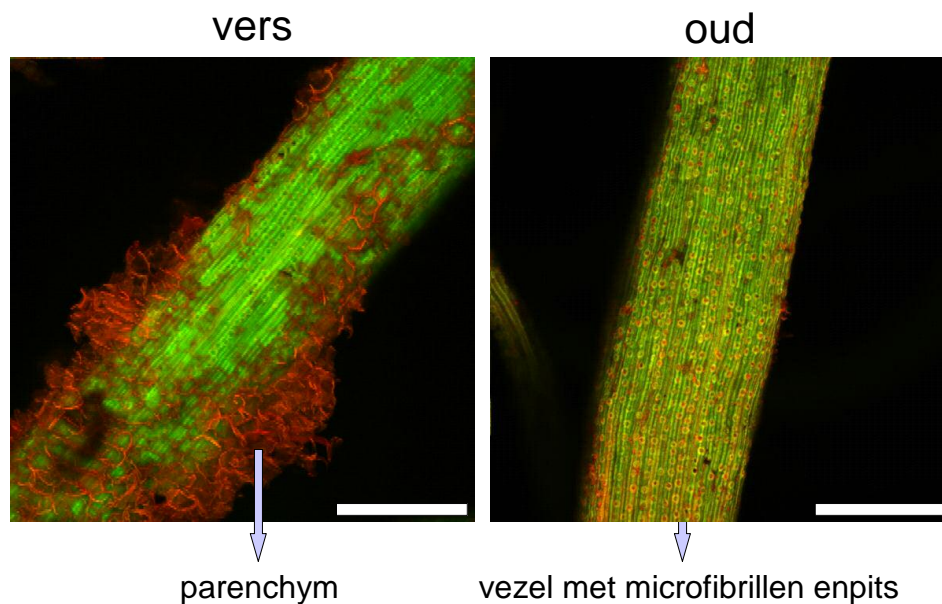
Figuur 12: zelfverwarming van twee houtmonsters en 3 kokosmonsters.

5.4 Vezelstructuur

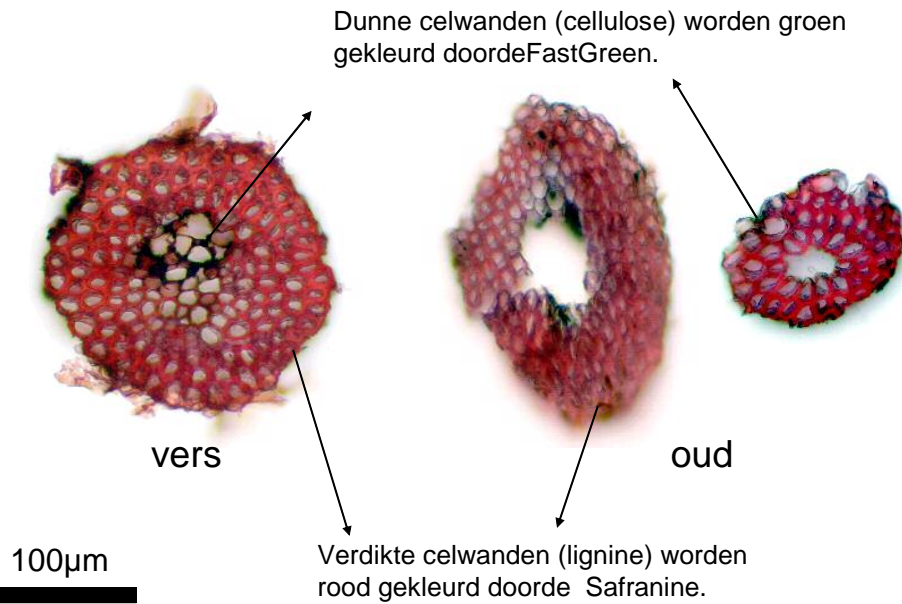
De vezelstructuur van enkele kokosmonsters is bestudeerd door middel van confocale laser scanning microscopie (CLSM), conventionele fluorescentie microscopie en lichtmicroscopie. De microscopische opnames (Figuur 13-15) lieten het volgende zien:

- Verse monsters zijn omgeven door parenchymweefsel, dat grotendeels bestaat uit cellulose. Cellulose wordt afgebroken naarmate de monsters verouderen (Figuur 13).
- Oude vezels zijn hol van binnen, versniet (Figuur 14)
- Door middel van fluorescentie microscopie kunnen cellulose en lignine worden aangekleurd (Figuur 15)

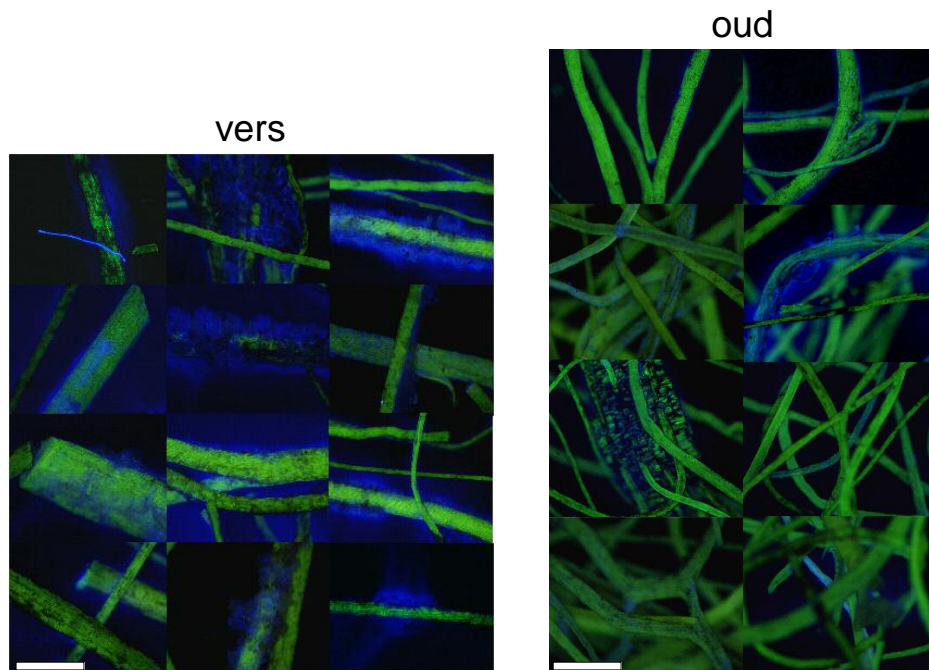
Aangezien fluorescentie microscopie minimale monsterbehandeling vergt (monsters behoeven niet te worden ingebed), kan kwantitatieve gegevens kan leveren, is dit een veelbelovend traject om ratio's cellulose en lignine te bepalen (zie verder hoofdstuk 6.4).



Figuur 13: microscopische (CLSM) opnames van kokoschips (vers, links) en voorbeeldvezels (oud, rechts). Het balkje in de figuur vertegenwoordigt een lengte van 0.25 mm



Figuur 14: microscopische (“gewone” lichtmicroscopie) opnames van chips (vers, links) en voorbeeldvezels (oud, rechts). Het betreft dwarsdoorsnedendoor de vezels. Lignine is aangekleurd met Safranine en cellulose met FastGreen. Het balkje in de Figuur vertegenwoordigt een lengte van 0.1mm



Figuur 15: Fluorescentiemicroscopie opnames van chips (vers) en voorbeeldvezel (oud). Cellulose is aangekleurd door een fluorescente kleurstof en wordt blauw afgebeeld. Lignine is groen afgebeeld. Het balkje in de Figuur vertegenwoordigt een lengte van 0.25mm

6 Tussenevaluatie

Naafloop van de eerste serie experimenten heeft een **evaluatie** plaats gevonden. Eris besloten alle vier de methoden verdere toetsen, maar nu met betoer gedefinieerde monsters. (zie plan van aanpak). In de evaluatie werd een eenpaar kantekeningen geplaatst ten aanzien van de interpretatie van de zuurstofmetingen.

Bij de **Oxitopmethode** wordt aangeënt met micro-organismen, en tevens wordt een nutriënt oplossing toegevoegd aan het organisch materiaal. Hierdoor rijst de vraag wat gemeten wordt, en of dit de juiste condities zijn om inzicht te krijgen in de ouderdom van het substraat. Het lijkt erop dat in de huidige opzet de potentie wordt gemeten van een overmaat micro-organismen om te groeien op substraat, dat tevens is voorzien van extra nutriënten. Het is de vraag of de zuurstofconsumptie van micro-organismen welke groeien op de toegevoegde nutriënten in het sterkmaskerend werkt op het overal plaatje van de zuurstofconsumptie. Omdat te onderzoeken zullen tevens metingen uit gevoerd worden bij de toevoeging van nutriënten achterwege wordt gelaten. Om te testen of de hoeveelheid endogeen micro-organismen op het substraat een indicatie kan zijn voor de ouderdom van het substraat, worden ook metingen gedaan zonder dat het organisch materiaal wordt aangeënt, al of niet met toevoeging van nutriënten.

Ofschoon al zonder aan tenent toevoeging van nutriënten onderscheid gemaakt kan worden tussen de verschillende monsters met gebruik van de **NIODmethode**, zullen ook metingen uitgevoerd worden met toevoeging van extra nutriënten aan tenent. Bepaald zal worden of dit nog een beter onderscheidend tussen de verschillende monsters geeft. Een tweede argument is dat uiteindelijk een uniform monsterbehandeling moet plaats vinden, en dat indien Oxitop, NIOD of een andere methode geselecteerd worden om de ouderdom van kokos sample te bepalen, de methoden vergelijkbaar moeten zijn in opzet, en monsters op een zelfde manier voorbehandeld moeten worden.

Verder heeft de eerste serie experimenten, waarbij naar vezelstructuur is gekeken, duidelijk gemaakt dat met **CLSM** (Confocal Laser Scanning Microscopie) mooie plaatjes gemaakt konden worden van vezels. Het was duidelijk te zien dat parenchymweefsel (bevat vooral cellulose) wordt afgebroken naar mate een monster ouder is (Figuur 13). Cellulose en lignine konden worden aangekleurd, maar de specificiteit van de kleuringmethode moest nog worden geoptimaliseerd. Omdat te bereiken is ook met "normale" lichtmicroscopie gewerkt. Ook dat gaf de structuurveranderingen weer tijdens het verouderingsproces; cellulose en lignine konden worden aangekleurd met respectievelijk fast green en safranin (Figuur 14).

Omdat deze methode tamelijk bewerkelijk is, is uiteindelijk nog een andere kleuring uitgevoerd namelijk Fluorescentie Microscopie, daarbij gebruik makend van de kleurstof Calcofluor White. Dit fluorochrome bindt specifiek aan cellulose, en emetteert licht bij 420 nm indien zij bij 350 nm geëxciteerd wordt. Om te oogis de kleuring van cellulose dan als een blauwe kleur waart nemen. Daarnaast geeft lignine autofluorescentie bij 520 nm (groene kleur) (Figuur 15). Groot voordeel van deze methode is dat hij non-destructief is en de monsterbehandeling eenvoudig is. Eris besloten om in de vervolgent experimenten verdere werken op basis van dit principe om te komen tot een eenvoudige opfluorescentie gebaseerde assay.

Ten aanzien van de **zelfverwarmingmethode** is besloten om voort te gaan op de ingeslagen weg. Om verschillen tussen de afzonderlijke monsterstemmen te worden in de vervolgent experimenten extra aandacht besteed aan de isolatie van de vaatjes waarin de incubaties plaats vonden.

7 Vervolgmetingen

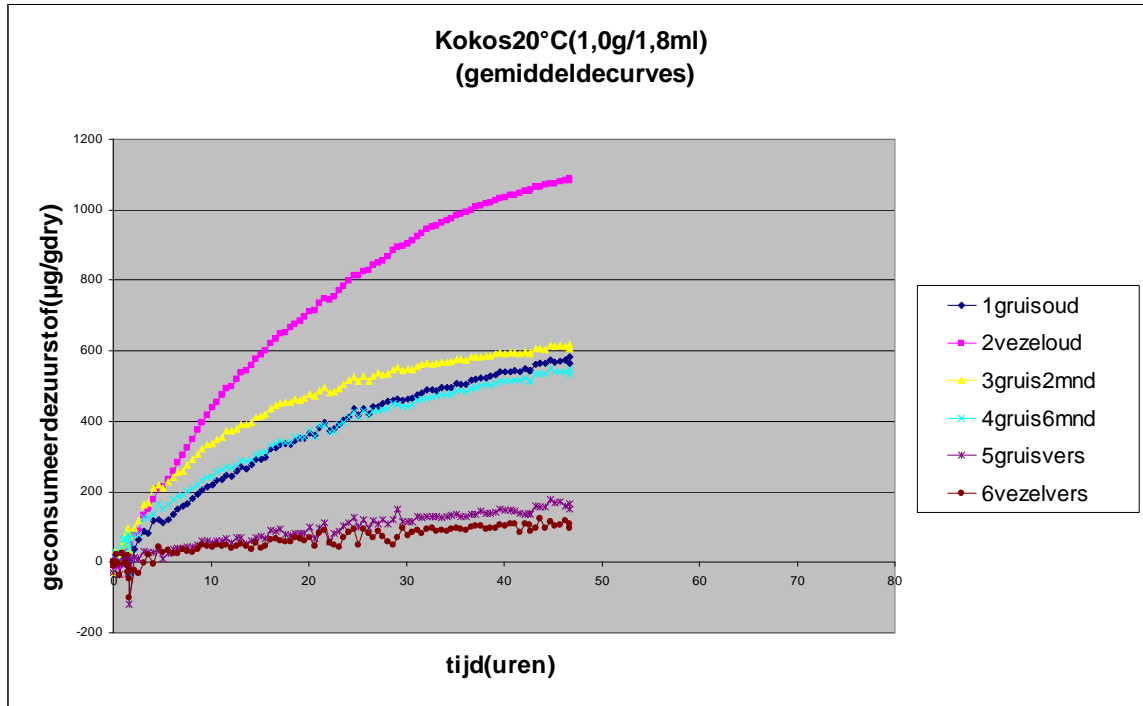
Ten behoeve van het vervolgonderzoek zijn een zesstal monsters geselecteerd, waarvan de ouderdom beter was gedefinieerd dan in de eerste serie monsters:

- 1 Kokosgruis: 2-3 jaar oud
- 2 Kokosvezel: oud
- 3 Kokosgruis: 2 maanden oud
- 4 Kokosgruis: 6 maanden oud
- 5 Kokosgruis: zeervers
- 6 Kokosvezel: zeervers

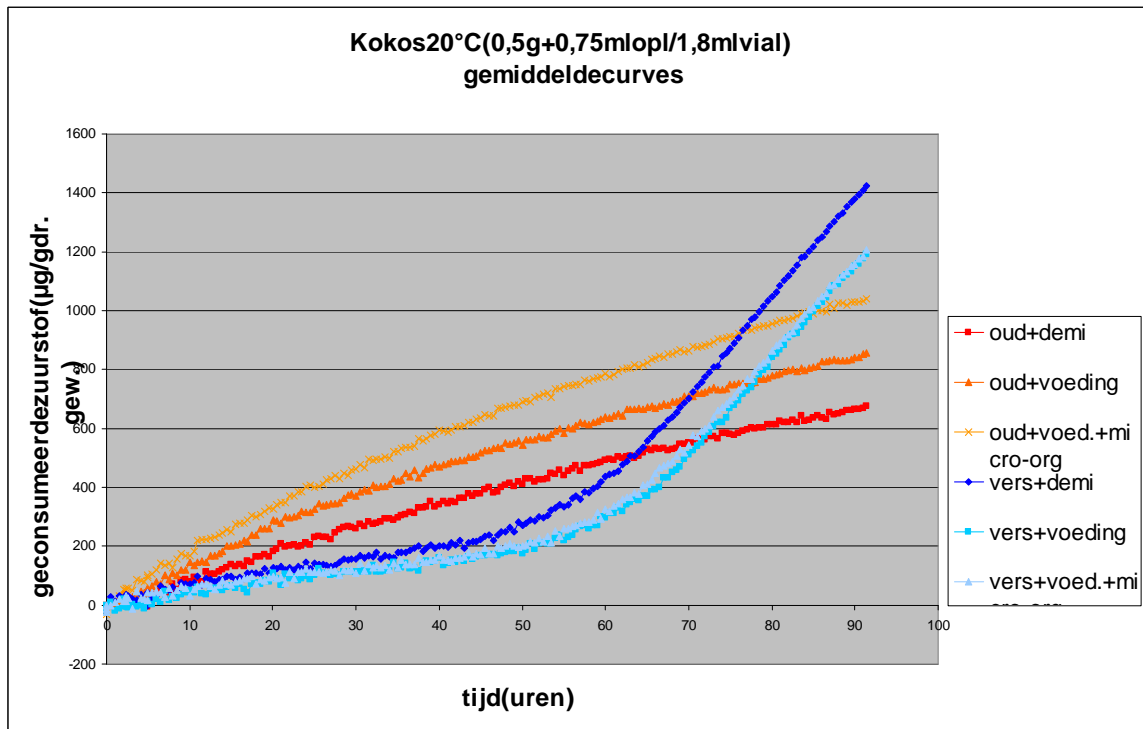
7.1 Zuurstofmetingen met de NIOD methode

De resultaten van de vervolgmetingen met de NIOD methode zijn weergegeven in de Figuren 16-19. De resultaten geven het volgende aan:

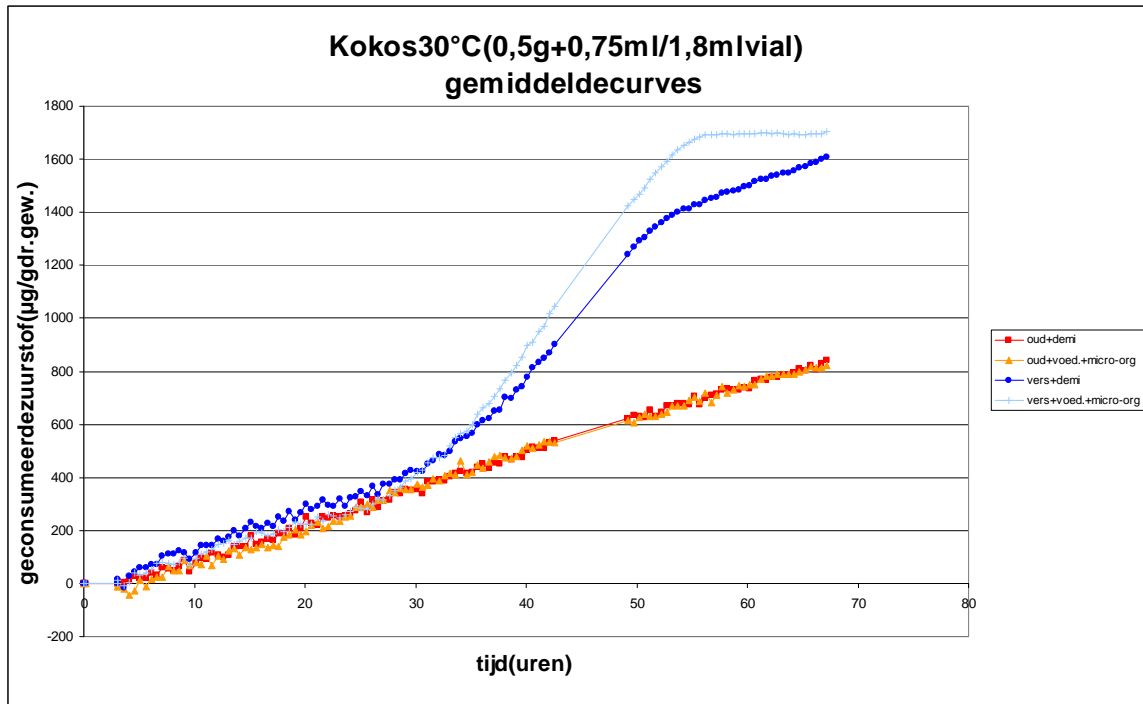
- De NIOD methode geeft in principe een goede relatie tussen zuurstofverbruik en ouderdom van kokosgruis en vezel, Figuren (17-19)
- Versmateriaal moet een aanloopfase doormaken (de lagfase; fase 2 in Figuur 3), waardoor het direct na incubatie juist een lage zuurstofconsumptie geeft dan oud materiaal (Figuur 16 en 17). Na de aanloopfase neemt het verbruik echter sterk toe, en is gecorreleerd aan de ouderdom van het materiaal (Figuur 17)
- De lagfase (in Figuur 17 ruim 2 dagen) kan verkort worden door de temperatuur te verhogen (afbraak gaat sneller bij hogere temperatuur), of de beschikbare hoeveelheid zuurstof te verkleinen.
- Het temperatuur effect is te zien als in Figuur 17 en 18 worden vergeleken. In Figuur 18 is bij 30°C geïncubeerd en stijgt het verbruik sterk na 30 uur, terwijl bij 20°C dat pas na 50 uur gebeurt. Het effect van de beschikbare hoeveelheid zuurstof in de meetkamer is duidelijk als in Figuur 18 en 19 worden vergeleken. In Figuur 19 is de meetkamer totaal afgevuuld met water; per volume eenheid bevat wat er veel (30 maal) minder zuurstof dan hetzelfde volume aan lucht. Als gevolg hiervan is de beschikbare zuurstof in de meetkamer veel sneller op, al voordat de lagfase van het vers sample is doorlopen.
- Het blijkt dat voor de NIOD methode toevoeging van voedingsoplossingen micro-organismen niet nodig is; de reactie wordt slechts beperkt versneld (zie Figuur 17 en 18). In principe veranderen de patronen van de zuurstofverbruikscurve niets. Verse monsters moeten een aanloopfase doorlopen, en pas daaraan een snelle consumptie toe.
- De maximale zuurstofverbruikssnelheid in vers materiaal is significant (ca. 3 maal) groter dan in oud gruis. Dit onderscheid is het best vanaf 30 uur na start van de meting waar te nemen (zie Figuur 18). In vers gruis is de snelheid maximaal ca. 50 µg/uur/gram droge stof.



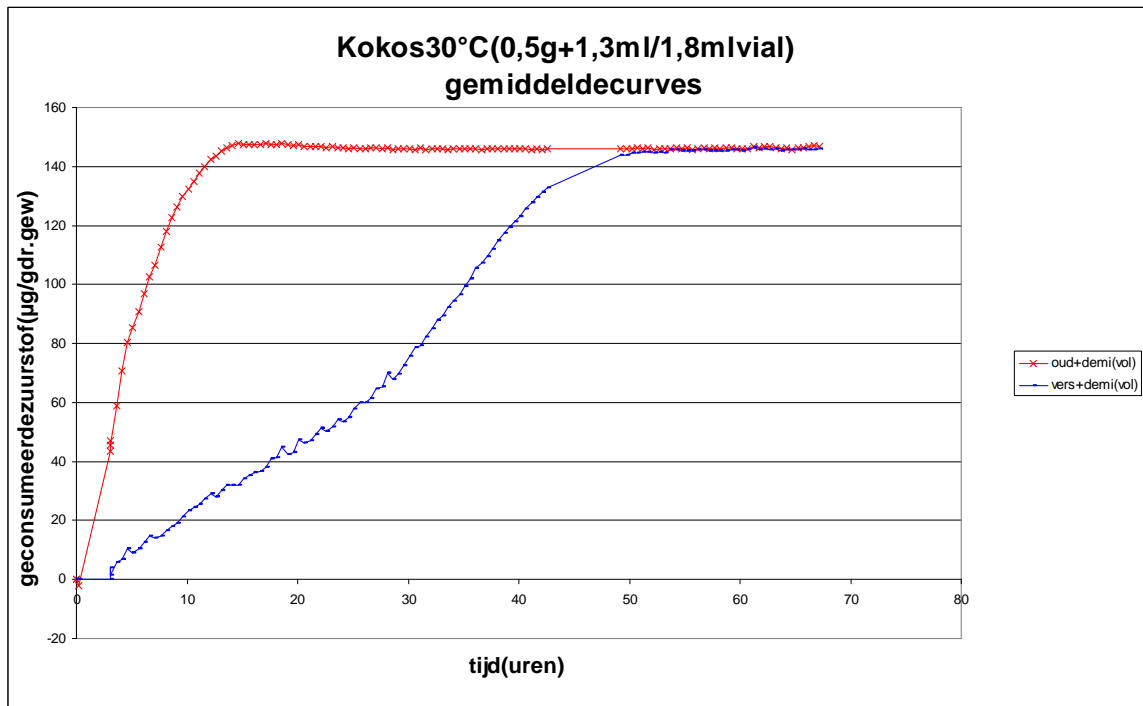
Figuur1 6: zuurstofmetingen van verschillende kokosmonsters. Zuurstofconsumptie is uitgedrukt als totaalverbruik in µg/g drogestof.



Figuur1 7: zuurstofmetingen van verschillende kokosmonsters. Zuurstofconsumptie is uitgedrukt als totaalverbruik in µg/g drogestof. Aan de monsters is alléén demiwater toegevoegd, of additioneel voedingsoplossingen micro-organismen.



Figuur 1 8: zuurstofmetingen van verschillende kokos smonters. Zuurstofconsumptie is uitgedrukt als totaalverbruik in $\mu\text{g/g}$ drogestof. Aan de monsters is alle endemiale water toegevoegd, of additioneel voedingsoplossingen micro-organismen.

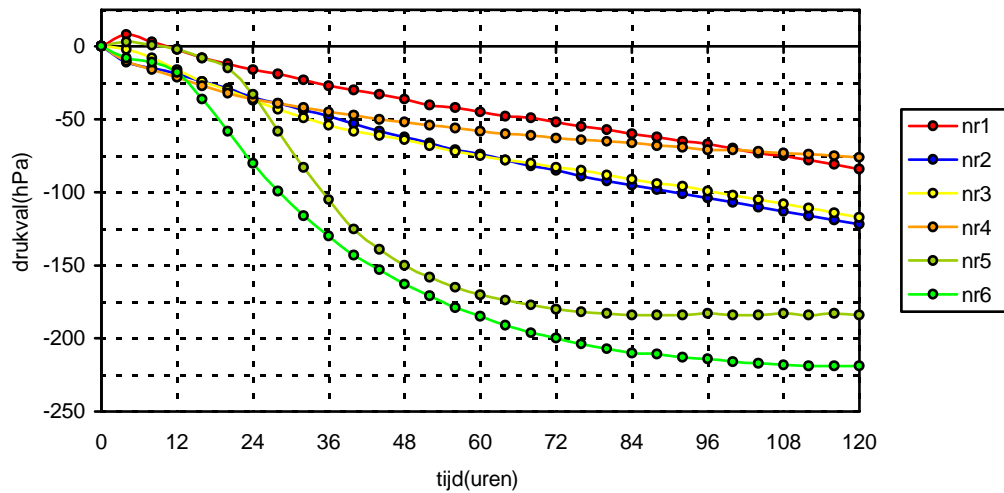


Figuur 1 9: zuurstofmetingen van verschillende kokos smonters. Zuurstofconsumptie is uitgedrukt als totaalverbruik in $\mu\text{g/g}$ drogestof. Aan de monsters is alle endemiale water toegevoegd, of additioneel voedingsoplossingen micro-organismen.

Uit de experimenten met de NIOD methode kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- Met de NIOD methode kan de zuurstofconsumptie van kosmonsters goed gemeten worden
- De methode is zeer eenvoudig uitvoerbaar
- Zuurstofconsumptiesnelheid is gerelateerd aan de ouderdom van kosmaterialen
- De NIOD methode kan verschillen in ouderdom van kosmaterialen aan de hand van de bepaalde zuurstofconsumptiesnelheid onderscheiden
- Een eerste onderscheid in ouderdom van kosmaterialen wordt al aangegeven in de NIOD methode vanaf 30 uur na inzet van de test

7.2 Zuurstofmetingen met de Oxitopmethode



Figuur 20 - Drukval bij kokosmonsters uit de tweede serie monsters bij een dosering van 20 g in Oxitopmethode

In een volgende stap zijn alle monsters uit de tweede serie monsters, welke beter gedefinieerd waren qua ouderdom met een dosering van 20 gram in duplo geanalyseerd. De duplo's werden daarbij in de tijd aangelegd.

De drukval karakteristiek en gegevens op het eerste gezicht aangeduidbaar gedefinieerde ouderdomsverschillen tussen de monsters weer. In de periode van 24 - 36 uur wordt alleen aangeduidbaar onderscheid zichtbaar. Toch is het in het licht van mogelijk optredende langere lagfasen niet aan te bevelen de test na 24 uur af te breken. Op grond van de eerste gegevens kan worden ingeschat dat de testduur van 48 uur een betrouwbare waarde van de respiratiesnelheid kan realiseren voor kokosgruis en kokosvezel.

De onderscheidbaarheid van de ouderdom van de kokosmaterialen komt ook naar voren in de berekende respiratiesnelheden. Deze zijn derhalve maatgevend voor het vaststellen van de verteringsgraad van kokosmaterialen.

Tabel 4 - Respiratiesnelheid voor oude vers kokosgruis bij diverse doseringen.

	Respiratiesnelheid (mmol O ₂ .kg ⁻¹ .OS.uur ⁻¹)
Nr1 -kokosgruis 2 -3jroud	1,4 ± 0,2
Nr2 -kokosvezeloud	1,7 ± 0,1
Nr3 -kokosgruis 2mndoud	2,6 ± 0,1
Nr4 -kokosgruis 6mndoud	1,1 ± 0,2
Nr5 -kokosgruiszeervers	9,8 ± 2,1
Nr6 -kokosvezelzeervers	9,0 ± 0,8

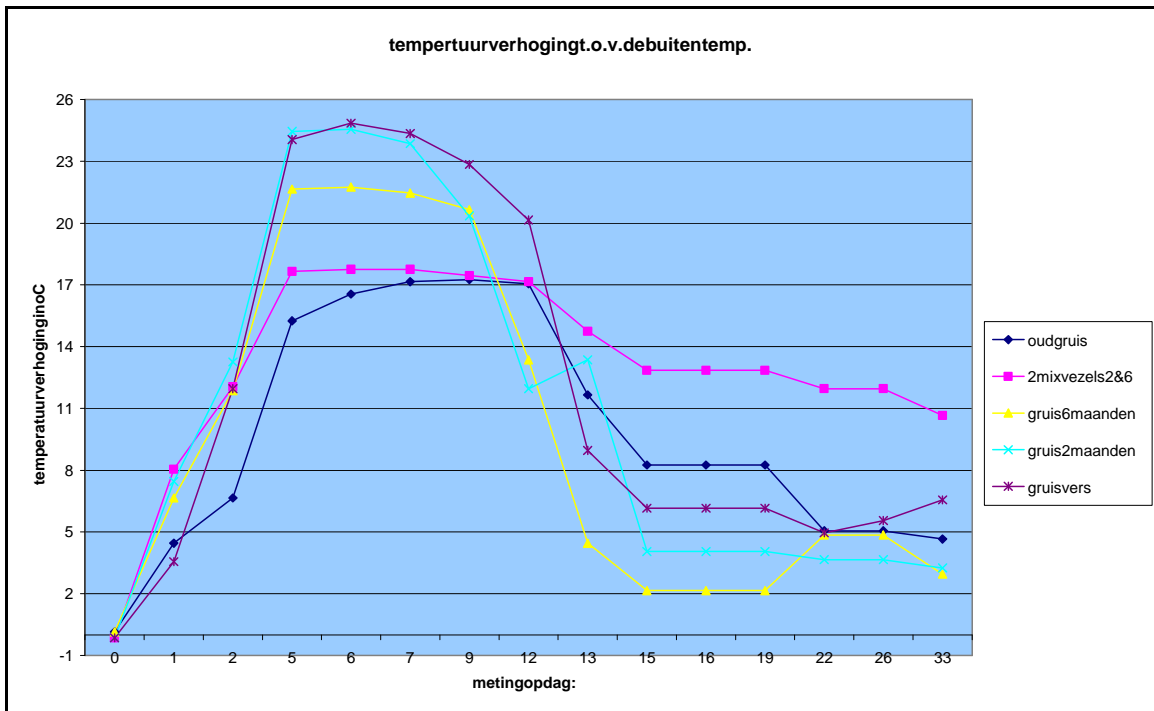
De experimenten met de Oxitop methode geven het volgende aan :

- Met de Oxitop methode is zuurstof consumptie goed te meten
- De methode is relatief eenvoudig uitvoerbaar
- Zuurstof consumptiesnelheid is gerelateerd aan de ouderdom van kokosmaterialen
- De Oxitop methode kan verschillen in ouderdom van kokosmaterialen aan de hand van de bepaalde zuurstof consumptiesnelheid onderscheiden
- Een eerste onderscheid in ouderdom van kokosmaterialen wordt aangegeven door de Oxitop methode vanaf 24 uur na inzet van de test

7.3 Zelfverwarming

De 4 gruismonsters en een mengsel van beide vezelmonsters zijn ook geanalyseerd door middel van de zelfverwarmingmethode. De resultaten zijn te zien in Figuur 21, en kunnen als volgt worden samengevat.

- De temperatuursverhoging tijdens zelfverwarming is gecorreleerd aan de ouderdom van de gruismonsters. Hoe verser het monster, des te groter de temperatuurstoename. Een oud gruismonster geeft een significant geringere temperatuurstoename dan de overige monsters. De verschillen in temperatuurstoename tussen het zeerveerse gruismonsters, het gruismonster van 2 maanden en dat van 6 maanden lijken niet significant.
- Onderscheid tussen de verschillende gruismonsters kan pas na ca. 5 dagen gemaakt worden.



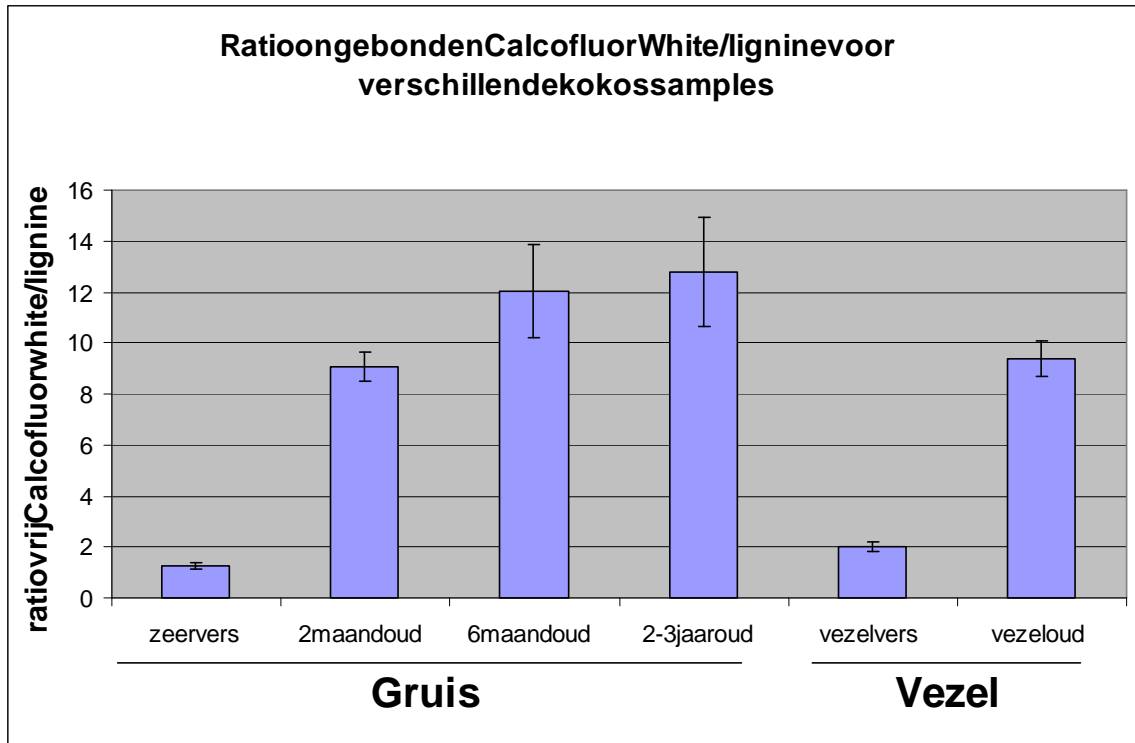
Figuur 21: zelfverwarming van kokosmonsters.

7.4 Vezelstructuur

De eerste experimenten lieten zien dat cellulose gevisualiseerd kon worden met fluorescentie microscopie, waarbij cellulose specifiek aangekleurd kon worden door middel van de kleurstof Calcofluor White. Tijdens de evaluatie is besloten om dit verder uit te werken en te onderzoeken of de ratio van lignine/cellulose kwantitatief bepaald kan worden op basis van fluorescentie die microscopisch is waargenomen. Deze ratio kan dan wellicht een indicatie geven over de ouderdom van kokosvezelengruis.

Het oorspronkelijke idee, waarbij door middel van beeldanalyse informatie over vezelstructuur wordt verkregen, is hiermee losgelaten. Voortschrijdend inzicht, op grond van de eerste serie experimenten (hoofdstuk 5.4) heeft duidelijk gemaakt dat fluorescentie spectrometrie ook informatie geeft over vezelstructuur, en bovendien eenvoudiger is uit te voeren. De methode is verder ontwikkeld, en in het kort komt het erop neer dat een monster wordt gemalen, gedroogd, en een fluorescente kleurstof (Calcofluor White) wordt toegevoegd, die vervolgens bindt aan cellulose. Hoe meer cellulose, hoe meer binding van Calcofluor White. Na centrifugatie zal de gebonden kleurstof neerslaan. In het supernatant is dan de hoeveelheid nietgebonden kleurstof een indicatie voor de cellulose in het monster: hoe minder in het supernatant, des te meer cellulose in het monster zat. Lignine wordt bepaald door autofluorescentie bij 520 nm (zonder toevoeging van kleurstof bij een bepaalde golflengte).

Figuur 22 laat de ratio Calcofluor White/lignine zien. Er is een heel duidelijke relatie tussen de ratio Calcofluor White/lignine en de ouderdom van het materiaal. Hoe verser het materiaal, des te meer cellulose, en des te lager de ratio. Opvallend is dat al onderscheid gemaakt kan worden tussen zeer verse monsters en monsters van 2 maanden oud. De hoeveelheid lignine (autofluorescentie) is vrijwel gelijk tussen de verschillende monsters. Hiermee is een autofluorescentie meting een goede kandidaat voor een aanvullende normalisatiemeting in een gestandaardiseerde testmethode.



Figuur 22: ratio ongebonden Calcofluor White/lignine in 4 kokosgruisen 2 kokosvezel monsters. De ratio is bepaald met fluorescentie spectrometrie

8 Conclusies en discussie

In dit project zijn gedurende de twee meetsessies enkele methoden getoetst op hun bruikbaarheid om de ouderdom van kokosgruis en kokosvezel te bepalen. Uit de metingen in dit project kunnen de volgende conclusies worden getrokken.

- Met zowel de **NIODmethode** als de **Oxitopmethode** kan de zuurstofconsumptie van kokosmonsters worden bepaald. Zuurstofconsumptie geeft een afspiegeling van de *microbiële activiteit* van de monsters. Er werd een goede correlatie gevonden tussen de zuurstofconsumptie en de ouderdom van de monsters. Dit onderscheid is het best waartoe nemen vanaf 30 uur na de start van de meting. Zuurstofconsumptiesnelheid van vers kokosgruis is circa 3 maal hoger als van oudgruis onder geconditioneerde omstandigheden.
- *Vezelstructuur* werd bestudeerd met behulp van **beeldanalyse**, waarbij verschillende microscopische technieken zijn gebruikt. Met CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopie) werd duidelijk dat parenchymweefsel (bevat vooral cellulose) wordt afgebroken naar mate van ouderdom. Cellulose en lignine konden worden aangekleurd, maar de specificiteit van de kleuringmethode moest nog worden geoptimaliseerd. Omdat te bereiken werd met "normale" lichtmicroscopie gewerkt. Ook dat gaf de structuurveranderingen weer tijdens het verouderingsproces; cellulose en lignine konden worden aangekleurd met respectievelijk fast green en safranine. Ook met behulp van fluorescentie microscopie konden cellulose en lignine specifiek worden aangekleurd. Deze kleuringen waren zeer eenvoudig te voeren: cellulose kleurde aan met de kleurstof Calcofluor White, terwijl lignine door autofluorescentie al te detecteren was.
- Op basis van het kleuring principe van de fluorescentie microscopie is een **fluorescentie spectrometriemeting** ontwikkeld. Hiermee kan de ratio Calcofluor White/lignine worden bepaald. Calcofluor White kleurt specifiek cellulose aan, en daarom kan met de ratio informatie over de ouderdom van kokosmateriaal worden verkregen: hoe lager de ratio, des te verser het kokosmonster. Deze methode is eenvoudig te uitvoeren, geeft aanvullende informatie op de zuurstofverbruiksmetingen (welke gebaseerd zijn op microbiële activiteit), omdat de methode informatie geeft over de vezelstructuur.
- Ook **elfververwarming** is gecorreleerd aan de ouderdom van kokosmonsters. De methode kent een langere looptijd dan de NIOD en Oxitopmethode, en het onderscheidend vermogen lijkt minder sterk.

9 Aanbevelingen

- De **NIOD methode** en de **Oxitopmethode** lijken vooralsnog beide geschikt om een definitieve methode en protocol te ontwikkelen, waarmee het mogelijk wordt om een beeld op te stellen, waarbij de toekomst van monsters van onbekende oorsprong valt af te leiden welke stabiliteitsstatus het materiaal heeft (uitwerken in een vervolgproject, fase 2). Een definitieve keuze, d.w.z. de bruikbaarheid voor een bepaald toepassingsgebied, kan pas aan de hand van de resultaten van fase 2 worden bepaald. Daarbij zal onder andere worden gelet op de robuustheid van de methode, betrouwbaarheid, prijs per meting, opschaalbaarheid en snelheid. Aangezien het voorstelbaar is dat beide methoden in de eerste eigen toepassingsgebied krijgen, lijkt het raadzaam beide methoden te betrekken in fase 2.
- Aangezien het onderscheidende vermogen van de **zelfverwarmingsmethode** geringer is dan van de NIOD methode en de Oxitopmethode, en de methode bovendien een aanzienlijk langer looptijd kent, lijkt het raadzaam deze methode niet te betrekken in fase 2.
- **Beeldanalyse** met behulp van CLSM, fluorescentie micros copie en gewone lichtmicroscopie geeft een goede indicatie van de ouderdom van het materiaal, waarbij cellulose en lignine goed zijn aantekleuren. Omdat deze methode niet gemakkelijk zijn, en specifieke kennis en apparatuur vereisen, lijkt het raadzaam deze methoden niet te betrekken in fase 2.
- Op basis van de resultaten van de fluorescentie microscopie is een **fluorescentie spectrometrie** meting ontwikkeld, waarmee de ratio cellulose/lignine eenvoudig en kwantitatief kan worden bepaald. Deze methode is eenvoudig uit te voeren, en omdat de ratio een aanwijzing is voor de ouderdom van het materiaal, en daarbij complementair is aan de methode die gebaseerd zijn op de microbiële activiteit, lijkt het raadzaam deze methoden te betrekken in fase 2. Bijkomend voordeel van deze metingen is dat omdat de hoeveelheid lignine vrijwel constant is bij de verschillende monsters, fluorescentie metingen gebruikt kunnen worden voor de normalisering van afzonderlijke bepalingen.