SV-411

Verantwoorde toepassing van rundermest in graslandbodems

Eindrapport

dr. R.G.M. de Goede (WU, Sectie Bodemkwaliteit)
dr. ir. P.C.J. van Vliet (WU, Sectie Bodemkwaliteit)
drs. B. van der Stelt (WU, Sectie Bodemkwaliteit)
ir. F.P.M. Verhoeven (WU, Leerstoelgroep Rurale Sociologie)
dr. ir. E.J.M. Temminghoff (WU, Sectie Bodemkwaliteit)
dr. J. Bloem (Alterra)
W.J. Dimmers (Alterra)
dr. G.A.J.M. Jagers op Akkerhuis (Alterra)
prof. dr. L. Brussaard (WU, Sectie Bodemkwaliteit)
prof. dr. ir. W.H. van Riemsdijk (WU, Sectie Bodemkwaliteit)

januari 2004

Gouda, SKB

Stichting Kennisontwikkeling Kennisoverdracht Bodem

Auteursrechten
Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze opgave 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 op enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van SKB.
Het is toegestaan overeenkomstig artikel 15a Auteurswet 1912 gegevens uit deze uitgave te citeren in artikelen, scripties en boeken mits de bron op duidelijke wijze wordt vermeld, alsmede de aanduiding van de maker, indien deze in de bron voorkomt, "©"Verantwoorde toepassing van rundermest in graslandbodems", januari 2004, SKB, Gouda."

Aansprakelijkheid
SKB en degenen die aan deze publicatie hebben meegewerkt, hebben een zo groot mogelijke zorgvuldigheid betracht bij het samenstellen van deze uitgave. Nochtans moet de mogelijkheid niet worden uitgesloten dat er toch fouten en onvolledigheden in deze uitgave voorkomen. Ieder gebruik van deze uitgave en gegevens daaruit is geheel voor eigen risico van de gebruiker en SKB sluit, mede ten behoeve van al degenen die aan deze uitgave hebben meegewerkt, iedere aansprakelijkheid uit voor schade die mocht voortvloeien uit het gebruik van deze uitgave en de daarin opgenomen gegevens, tenzij de schade mocht voortvloeien uit opzet of grove schuld zijdens SKB en/of degenen die aan deze uitgave hebben meegewerkt.

Copyrights
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording and/or otherwise, without the prior written permission of SKB.
It is allowed, in accordance with article 15a Netherlands Copyright Act 1912, to quote data from this publication in order to be used in articles, essays and books, unless the source of the quotation, and, insofar as this has been published, the name of the author, are clearly mentioned, "©"Sustainable application of cattle manure slurry in grassland soils", January 2004, SKB, Gouda, The Netherlands."

Liability
SKB and all contributors to this publication have taken every possible care by the preparation of this publication. However, it can not be guaranteed that this publication is complete and/or free of faults. The use of this publication and data from this publication is entirely for the user's own risk and SKB hereby excludes any and all liability for any and all damage which may result from the use of this publication or data from this publication, except insofar as this damage is a result of intentional fault or gross negligence of SKB and/or the contributors.

Titel rapport
Verantwoorde toepassing van rundermest in graslandbodems

Eindrapport

SKB rapportnummer
SV-411

Project rapportnummer
SV-411

Auteur(s)
dr. R.G.M. de Goede, dr. ir. P.C.J. van Vliet
drs. B. van der Stelt, dr. ir. E.J.M. Temminghoff
ir. F. Verhoeven, dr. J. Bloem

Aantal bladzijden
Rapport: 48
Bijlagen: -

Uitvoerende organisatie(s) (Consortium)
Wageningen Universiteit, Bodemkwaliteit (dr. R.G.M. de Goede, dr. ir. P.C.J. van Vliet, dr. ir. E.J.M. Temminghoff, drs. B. van der Stelt, prof. dr. L. Brussaard, dr. ir. W.H. van Riemsdijk)
Wageningen Universiteit, Rurale Sociologie (ir. F.P.M. Verhoeven)
Alterra (dr. J. Bloem, W.J. Dimmers, dr. G.A.J.M. Jagers op Akkerhuis)

Uitgever
SKB, Gouda

Samenvatting
Melkveehouders verenigd in de Friese milieucoöperaties VEL en VANLA hebben in samenwerking met wetenschappers van Wageningen UR een model ontwikkeld dat erin moet voorzien dat zij de door de overheid gestelde doelstellingen ten aanzien van o.a. ammoniakemissie en nitraatuitspoeling op een milieuvriendelijke manier kunnen realiseren. Het plan van aanpak richtte zich op aanpassingen in het rantsoen van de koeien, verminderd krachtvoer en kunstmest gebruik, en het later maaien van het gewas. Optimalisatie van mest- en bodemkwaliteit staan hierbij centraal. Dit rapport is een verslag van de eerste twee van in totaal vier onderzoeksjaren. Er werd een methode ontwikkeld (DMT-manure cel) waarmee *in situ* in drijfmest vrije nutriëntenconcentraties (o.a. NH_4^+) kunnen worden gemeten. Aanpassingen in het rantsoen van de koe resulteerden in drijfmesten met lagere NH_4^+-concentraties en een lagere NH_3-emissie. Gebruik van een microbieel preparaat (EM) ter verdere verbetering van drijfmest resulteerde niet in een aangepaste microbiële gemeenschap in de mest en had geen effect op de gewasgroei en de NH_3-emissie. Toevoeging van het additief Euro mest-mix aan de drijfmest reduceerde NH_3-emissie bij lage temperatuur en zolang de mest niet werd gemixed. Het aanbrengen van Euro mest-mix mest bovengronds of via zodenbemesting had geen effecten op respiratie en aantallen potwormen in een veldexperiment. Negatieve effecten van zodenbemesting op regenwormdichtheden waren alleen aantoonbaar in seizoenen met hoge aantallen regenwormen.

Trefwoorden

Gecontroleerde termen
ammoniak, analysemethoden, bacteriën, dierlijke mest, regenwormen (grasland, melkkoeien, landbouw, nematoden, bodemvruchtbaarheid, stikstof, voorlichting, geleedpotigen)

Vrije trefwoorden
bodemfauna, mestinjectie
Effectieve Micro-organismen, melkveehouderij, mestkwaliteit (additieven)

Titel project
Verantwoorde toepassing van rundermest in graslandbodems

Projectleiding
WU, Bodemkwaliteit
(dr. R.G.M. de Goede,
tel. 0317-485048/482339)

Dit rapport is verkrijgbaar bij:
SKB, Postbus 420, 2800 AK Gouda

Report title
Sustainable application of cattle manure slurry in grassland soils

Final report

SKB report number
SV-411

Project report number
SV-411

Author(s)
dr. R.G.M. de Goede, dr. ir. P.C.J. van Vliet
drs. B. van der Stelt, dr. ir. E.J.M. Temminghoff
ir. F. Verhoeven, dr. J. Bloem

Number of pages
Report: 48
Appendices: -

Executive organisation(s) (Consortium)
Wageningen Universiteit, Bodemkwaliteit (dr. R.G.M. de Goede, dr. ir. P.C.J. van Vliet, dr. ir. E.J.M. Temminghoff, drs. B. van der Stelt, prof. dr. L. Brussaard, dr. ir. W.H. van Riemsdijk)
Wageningen Universiteit, Rurale Sociologie (ir. F.P.M. Verhoeven)
Alterra (dr. J. Bloem, W.J. Dimmers, dr. G.A.J.M. Jagers op Akkerhuis)

Publisher
SKB, Gouda

Abstract
Dairy farmers of the Frisian environmental co-operatives VEL & VANLA and scientists of Wageningen University & Research have developed an ecologically sound model to meet legislation requirements, especially for nitrogen leaching and ammonia volatilisation. For this reason farmers have adjusted cattle rations, are using less concentrates and fertilizer and are cutting their grass at a more mature stage. Optimalisation of manure and soil quality are main topics in this approach. This report contains data of research performed in the first half of a 4 year project. A method to measure *in situ* nutrient concentrations (incl. NH_4^+) in manure slurry has been developed (DMT-manure cell). Lowering the crude protein content in the diet resulted in manure slurries with lower NH_4^+ concentrations and lower NH_3 volatilisation. Adding Effective Micro-organisms (EM) to improve manure quality did not result in different microbial communities in the manure and had no effect on grass production and ammonia volatilisation. The additive Euro mest-mix reduced ammonia volatilisation at low temperatures and non-mixing conditions. No effects on respiration and potworms were found in a field experiment with either aboveground Euro mest-mix manure slurry spreading or slit injection. Negative effects of slit injection on earthworm abundances were only found in the period that high numbers of earthworms were present.

Keywords
Controlled terms
ammonia, chemical analysis methods, bacteria, cattle manure slurry, earthworms (grassland, dairy cows, agriculture, nematodes, nitrogen, knowledge transfer, arthropods, soil fertility)

Uncontrolled terms
soil fauna, slit-injection Effective Microbes, dairy farming, manure slurry quality (additives)

Project title
Sustainable application of cattle manure slurry in grassland soils

Projectmanagement
WU, dept. of Soil Quality
(dr. R.G.M. de Goede,
tel. 0317-485048/482339)

This report can be obtained by: SKB, PO Box 420, 2800 AK Gouda, The Netherlands
Netherlands Centre for Soil Quality Management and Knowledge Transfer (SKB)

INHOUD

SAMENVATTING IV

SUMMARY IX

Hoofdstuk 1 INLEIDING 1

Hoofdstuk 2 WERKZAAMHEDEN 5
- 2.1 Methode voor chemische karakterisering van drijfmest 5
- 2.2 Invloed van rantsoensamenstelling op de microbiële samenstelling in mest 5
- 2.3 Invloed van rantsoensamenstelling op de ammoniak-vervluchtiging in mest 5
- 2.4 Overleving van toegevoegde bacteriën in mest 6
- 2.5 Effect van EM-mest op grasgroei 7
- 2.6 Invloed van toevoegmiddelen op de ammoniakemissie uit mest 7
- 2.7 Effecten van mestaanwendingsmethodiek op de samenstelling van de bodemfauna in grasland 8

Hoofdstuk 3 RESULTATEN 10
- 3.1 Methode voor chemische karakterisering van drijfmest 10
- 3.2 Invloed van rantsoensamenstelling op de microbiële samenstelling in mest 12
- 3.3 Invloed van rantsoensamenstelling op de ammoniak-vervluchtiging in drijfmest 18
- 3.4 Overleving van toegevoegde micro-organismen in mest 20
- 3.5 Effect van EM-mest op grasgroei 27
- 3.6 Invloed van toevoegmiddelen op de ammoniakemissie uit drijfmest 28
- 3.7 Effecten van mestaanwendingsmethodiek op de samenstelling van de bodemfauna in grasland 33
- 3.8 Communicatie 40
- 3.8.1 Publiciteit 41
- 3.8.2 Excursies, bijeenkomsten & voordrachten 43

Hoofdstuk 4 CONCLUSIES 47

LITERATUUR 49

SAMENVATTING

Verantwoorde toepassing van rundermest in graslandbodems

Het project “Verantwoorde toepassing van rundermest in graslandbodems” maakt onderdeel uit van het VEL & VANLA Mineralenproject. VEL (Vereniging Eastermars Lânsdouwe) en VANLA (Vereniging Agrarisch Natuur- en Landschapsbeheer Achtkarspelen) zijn twee Friese milieucoöperaties in de omgeving van Oostermeer/Achtkarspelen in Friesland die zich ten doel hebben gesteld om de doelstellingen ten aanzien van emissies van stikstof en andere meststoffen op een milieuvriendelijke manier te realiseren. Zij houden daarbij rekening met de karakteristieke eigenschappen van het Noord-Friese woudenlandschap. In overleg met de overheid is tot een aantal gebiedsspecifieke afspraken gekomen [Dubbeldam, 2000]. In het kader van het VEL & VANLA Mineralenproject mogen de boeren van de coöperaties in de herfst op de hoge zandgronden 14 dagen langer mest uitrijden dan elders in Nederland. Er is een speciale ‘gebiedsvriendelijke’ machine ontwikkeld voor het uitrijden van mest. Er wordt geëxperimenteerd met verschillende mesttoevoegmiddelen, zoals Euro mest-mix (MX, dat geacht wordt mest te composteren) en Effectieve Micro-organismen (EM). Boeren die gebruik maken van MX-mest hebben tijdelijk toestemming gekregen om de mest bovengronds uit te rijden in plaats van deze te moeten injecteren. Als tegenprestatie moeten de deelnemende boeren versneld voldoen aan de door de overheid gestelde normen van het mestbeleid.

In samenwerking met wetenschappers van Wageningen UR is een model ontwikkeld dat erin moet voorzien dat de melkveehouders de door de overheid gestelde doelstellingen ten aanzien van o.a. ammoniakemissie en nitraatuitspoeling op een milieuvriendelijke manier kunnen realiseren. Het plan van aanpak richt zich op aanpassingen in het rantsoen van de koeien, verminderd krachtvoer- en kunstmestgebruik, en het later maaien van het gewas. Optimalisatie van mest- en bodemkwaliteit staan hierbij centraal.
Uitgangspunt is dat door aanpassing van de samenstelling van het rantsoen van de koe de kwaliteit van de mest kan worden beïnvloed en dat toepassing van deze mest leidt tot fysische, chemische en biologische veranderingen in de bodem die bijdragen aan verminderde emissies van nutriënten en een efficiëntere nutriëntenhuishouding naar de plant.

Het voorliggende rapport is een verslag van de eerste twee van in totaal vier onderzoeksjaren waarin onderzoek wordt verricht naar de gevolgen van de VEL & VANLA aanpak voor de componenten mest en bodem.

Methode voor chemische karakterisering van drijfmest
In hoofdstuk 3.1 wordt een methode gepresenteerd waarmee *in situ* de kwalitatieve samenstelling van de drijfmest, met name de vrije ammoniumconcentratie, kan worden bepaald. Het is de vrije ammonium die kan vervluchtigen in de vorm van ammoniak en daarmee bijdraagt aan ongewenste N-emissies. Hiervoor is een variant van de Donnan Membraan Techniek (DMT) ontwikkeld die het mogelijk maakt om vrije kationen zoals NH_4^+, Mg_2^+, Ca_2^+, Na^+ en K^+ concentraties in de waterfase van de drijfmest te bepalen. Met de DMT-manure cel kunnen *in situ* metingen worden verricht in mest-opslagsystemen. De DMT-manure cel is opgebouwd uit 3 perspex ringen, die van elkaar gescheiden zijn door twee negatief geladen membranen (figuur 4). Het compartiment dat is ingesloten tussen de beide membranen is het zogenaamde acceptorcompartiment. Het acceptorcompartiment wordt gevuld met een oplossing waarvan de samenstelling is gebaseerd op de gemiddelde kationensamenstelling van mest. Wanneer de cel in de drijfmest wordt geplaatst vindt er uitwisseling plaats van vrije kationen (positief geladen deeltjes) over het negatief geladen membraan tussen de drijfmest en de acceptorvloeistof. Als na verloop van tijd de vrije kationen in de DMT-manure cel (acceptor) in evenwicht zijn gekomen

met de kationen in de mest kan een monster worden genomen van de vloeistof in het acceptor-compartiment. In dit monster worden in het laboratorium de concentraties aan ammonium en andere vrije kationen bepaald.
In hoofdstuk 3.1 worden de resultaten van een test van de DMT-manure cel beschreven in de paragraaf 'bepaling van de bufferende werking van mest en validatie DMT-manure cel'. De resultaten laten zien dat de DMT-manure cel uitstekend geschikt is om vrije nutriëntenconcentraties in drijfmest te meten en daarmee een waardevol instrument kan zijn voor de bepaling van concentraties aan vrij ammonium in drijfmest.

Invloed van rantsoensamentstelling op de microbiële samenstelling in mest
Binnen het VEL & VANLA Mineralenproject wordt via aanpassing van het rantsoen gestreefd naar de productie van mest met aangepaste samenstelling (kwaliteit). Deze mest heeft onder andere een hogere C/N verhouding en bevat relatief weinig mineraalgebonden stikstof ten opzichte van organisch gebonden stikstof. Onderzocht werd of de aanpassingen in het rantsoen gevolgen hadden voor de samenstelling van de microbiële gemeenschap in de mest. Deze microben zijn verantwoordelijk voor de decompositie van de organische stof in de mest en spelen daarbij een belangrijke rol bij het beschikbaar komen (mineralisatie) van o.a. de organisch gebonden stikstof ammonium en nitraat.
Op een proefboerderij werd een experiment uitgevoerd met 16 koeien die in tweetallen werden gevoerd met 8 verschillende rantsoenen. De rantsoenen verschilden in ruw eiwit- en energieniveau (ruw eiwit ofwel RE: 110 en 200 g/kg ds: Verterings Eenheid Melk ofwel VEM: 750 en 975). Nadat de koeien 6 weken waren gevoerd met één van de 8 rantsoenen werd vaste mest verzameld waarin de microbiële gemeenschap werd onderzocht. Hiertoe werden het totaal aantal bacteriën, de bacteriële groeisnelheid (thymidine- en leucineinbouw) en de bacteriële diversiteit (DGGE profielen) bepaald.
De aanpassingen in het rantsoen van de koeien bleken geen effect te hebben op de soortensamenstelling van de bacteriële darmflora (figuur 9). De aanpassingen hadden daarentegen wel gevolgen voor de onderlinge aantal- en biomassaverhoudingen binnen de bacteriegemeenschap (figuur 10). Het rantsoen dat het meeste leek op de gangbare praktijk (eiwitrijk rantsoen van jonge graskuil) bevatte een hoge bacteriebiomassa (5000 μg C g^{-1}) en de activiteit van de bacteriegemeenschap in deze mest was relatief laag (figuur 13 en 14). Dit rantsoen is rijk aan stikstof en makkelijk afbreekbare koolstofbronnen (tabel 3), zodat na darmpassage een door koolstofbeperking tamelijk inactieve microbiële populatie resteert. Rantsoenen die meer passen binnen de VEL & VANLA Mineralenprojectaanpak gaan in de richting van een eiwitarm rantsoen van oude graskuil. De bacteriële biomassa in de mest van dit rantsoen was verlaagd (3000 μg C g^{-1}), terwijl de groeisnelheid zeer hoog was. Deze bacteriepopulaties werden nu niet beperkt door koolstof en konden zich juist voorzien in hun stikstofbehoefte (C/N ratio 15-20). Hierdoor was het gehalte aan minerale stikstof in de mest van dit rantsoen zeer laag.
De veranderingen in het rantsoen leidden dus tot veranderingen in de samenstelling van de darmflora. Deze veranderingen bleken vooral te worden gestuurd door het eiwitgehalte van het voer. Het zou zo kunnen zijn dat een verlaging van het eiwitgehalte via een verlaagde N-beschikbaarheid heeft geleid tot een relatieve verschuiving binnen de bacteriële gemeenschap in het voordeel van bacteriën met een relatief hoge N-efficiëntie. Dit vereist echter nader onderzoek.

Invloed van rantsoensamenstelling op de ammoniakvervluchtiging in drijfmest
De hoeveelheid stikstof die uit drijfmest kan vervluchtigen in de vorm van ammoniak wordt voor een belangrijk deel bepaald door de samenstelling van de mest, die op haar beurt wordt bepaald door de rantsoensamenstelling van de koe. Onderzocht is of aanpassingen van het rantsoen volgens de VEL & VANLA Mineralenprojectaanpak, dat wil zeggen een vezelrijker en eiwitarmer rantsoen, resulteerden in een mest met een lagere ammoniakvervluchtiging. Hiertoe werd ge-

bruik gemaakt van dezelfde mesten als die uit de voorgaande paragraaf, echter nadat deze met urine waren gemengd tot drijfmest. Er werden *in situ* metingen verricht aan de vrije nutriënten-concentraties in de mestopslag en de ammoniakvervluchtiging werd onder experimentele omstandigheden gemeten.
Drijfmesten geproduceerd op rantsoenen met een hoog ruw-eiwitgehalte hadden een grotere zoutsterkte en ook een hogere pH (tabel 4). Bovendien hadden deze drijfmesten een grotere fractie vrij ammonium (tabel 5). Geheel volgens verwachting was ook de ammoniakvervluchtiging uit deze eiwitrijke mesten significant hoger dan de ammoniakvervluchtiging uit de drijfmesten die werden geproduceerd op een eiwitarm dieet (figuur 15). Ook de energie-inhoud (gehalte aan moeilijk verteerbare vezels) van het rantsoen had effect op de ammoniakvervluchtiging, zij het in mindere mate dan het eiwitgehalte van het rantsoen. Drijfmest geproduceerd op een rantsoen met een lage energie-inhoud (vezelrijk) had een verhoogde ammoniakvervluchtiging.
Er kon worden geconcludeerd dat aanpassingen in het rantsoen van de koe in de lijn van de VEL & VANLA Mineralenprojectaanpak, resulteerden in drijfmesten met lagere NH_4^+-concentraties en een lagere ammoniakvervluchtiging.

Overleving van toegevoegde bacteriën in mest
Er bestaan diverse additieven die binnen de melkveehouderij worden toegevoegd aan drijfmest ter verbetering van de kwaliteit van deze mest. Eén van dergelijke producten is Effectieve Microorganismen (EM) dat door een selectie van boeren binnen het VEL & VANLA Mineralenproject in de practijk wordt toegepast. Aan het gebruik van EM worden vele gunstige effecten toegeschreven, waaronder een reductie van de ammoniakvervluchtiging uit drijfmest. In het huidige onderzoek werd experimenteel onderzoek verricht naar mogelijke effecten van toevoeging van EM aan drijfmest op de grasgroei en ammoniakvervluchtiging. Daartoe werd allereerst de bacteriële diversiteit van het EM-preparaat onderzocht (via DGGE) en werd onderzocht of de bacteriën in EM in staat zijn significante populaties op te bouwen en te onderhouden in drijfmest. Omdat de producent van EM adviseert het EM te gebruiken in combinatie met Agri-mest werd ook dit product in het onderzoek betrokken.
In twee onderzochte EM-stocks werden respectievelijk 12 en 15 bacterietaxa aangetroffen. De overeenkomst tussen de beide stocks was laag (figuur 16). Aktivatie van de stocks tot een EM-Aktief oplossing (d.w.z. een noodzakelijke incubatie van EM op een voedingsmedium voordat het product kan worden toegepast in drijfmest) resulteerde soms in een toename van het aantal bacterietaxa (tot maximaal 35 taxa; figuur 16). Net als bij de stockoplossingen bestonden er ook tussen de EM-Aktiefoplossingen aanzienlijke verschillen in bacteriële taxasamenstelling, hetgeen duidt op een slechte reproduceerbaarheid van de samenstelling van dergelijke cultures. Toevoeging van EM-Aktief aan drijfmest, al dan niet in combinatie met Agri-mest, leidde niet tot aantoonbare veranderingen in de samenstelling van de bacteriegemeenschap in de drijfmest (figuur 17). Bacterietaxa die uniek waren voor de EM-Aktief werden in geen enkel geval teruggevonden in de drijfmest. Klaarblijkelijk overleven deze bacteriën niet in de mest of komen zij slechts in zeer lage dichtheden voor.

Effect van EM op ammoniakvervluchtiging en gewasgroei
De ammoniakvervluchtiging uit drijfmest werd niet aantoonbaar beïnvloed door het gebruik van EM. Het additief Euro mest-mix (MX) daarentegen resulteerde onder zeer specifieke omstandigheden in een statistisch significante verlaging (38%) van de ammoniakvervluchtiging. Het effect van MX werd alleen gevonden in mest die werd opgeslagen bij een lage temperatuur (4°C) met lage microbiële activiteit en die bovendien niet werd geroerd/gemixed (figuur 26). Ook toepassing van Agri-mest resulteerde in een vergelijkbare verlaging van de ammoniakvervluchtiging, zij het dat deze nu niet statistisch significant was. Bij hogere temperaturen en bij roeren van de mest waren deze effecten niet aantoonbaar.

Geheel in overeenstemming met voorgaande bevindingen had toepassing van de EM-drijfmest ook geen enkel aantoonbaar effect op de biomassaproductie en de stikstofopname van Engels raaigras (*Lolium perenne*) in een potproef (figuur 24, 25). Wel was er een klein effect van Agrimest dat zorgde voor een iets verlaagde stikstofopname door de plant (figuur 25).

Effecten van mestaanwendingsmethode op de samenstelling van de bodemfauna

In het VEL & VANLA Mineralenproject worden externe inputs van stikstof (kunstmest) tot een minimum beperkt en wordt voor de nutriëntenvoorziening van het gewas een maximaal beroep gedaan op organische (drijf)mest als nutriëntenleverancier voor de plant. Bovendien wordt ernaar gestreefd dat de geproduceerde drijfmest een lage $N_{mineraal}$ / $N_{organisch}$ verhouding heeft. Omdat de decompositie van mest en de mineralisatie van stikstof uit de organisch gebonden fractie biologische processen zijn, is een goed ontwikkelde bodemlevensgemeenschap van groot belang. Vele boeren zijn van mening dat zodenbemesting en mestinjectie negatieve effecten hebben op het bodemleven. De verplichting van de overheid om drijfmest emissiearm uit te rijden is volgens hen dan ook strijdig met het ontwikkelen van een goede bodemlevensgemeenschap.

Op een proefveld werd onderzocht wat de effecten zijn van zodenbemesting op een selectie van bodemdieren, namelijk regenwormen, potwormen, mijten, springstaarten en nematoden. Het onderzoek werd verricht in het voorjaar van 2002 en werd herhaald in de zomer van 2003. Allereerst werd het effect van zodenbemesting vergeleken met dat van bovengrondse mesttoediening. Vervolgens werd voor zodenbemesting het effect van enerzijds het doorsnijden van de graszode en anderzijds het effect van drijfmest (Euro mest-mix drijfmest) op deze bodemfauna onderzocht. Zodenbemesting had geen aantoonbare effecten op de aantallen potwormen, mijten en springstaarten (figuur 28-30). Bovendien waren er geen effecten op de soortensamenstelling van de mijten- en springstaartengemeenschap. Binnen de nematodengemeenschap leidde zodenbemesting tot een relatief groter aandeel ‘enrichment opportunisten’ (vermestingsindicatoren) vergeleken met bovengrondse bemesting. Het snijden van de graszode resulteerde in een afname van het aantal endoparasitaire nematoden in de grond. Kennelijk had snijden een effect op de ontwikkeling van het gras waardoor de vrijlevend endoparasieten de plantenwortels zijn ingegaan. Zodenbemesting zonder EM resulteerde in een statistisch significante verlaging van het totaal aantal regenwormen (figuur 34). Echter, de effecten op het totaal aantal regenwormen waren alleen statistisch significant in het relatief natte voorjaar van 2002. In de droge zomer van 2003 werden zeer lage regenwormdichtheden aangetroffen en het merendeel van deze regenwormen was inactief in diapauze in de grond aanwezig. Drijfmest bleek een negatief effect te hebben op de aan de oppervlakte levende (epigene) regenwormen (figuur 36). Vooral het aandeel juveniele *Lumbricus rubellus* (een epigene soort) was sterk verminderd na bemesting. De resultaten van het huidige onderzoek wijzen op geringere effecten van zodenbemesting op regenwormen dan die welke werden gevonden door De Goede e.a. [2003].

Communicatie

Het wetenschappelijk onderzoek binnen het VEL & VANLA Mineralenproject werd geïnitieerd door de boeren van de milieucoöperaties. Kenmerkend voor het project is dat er vanaf de start een intensieve uitwisseling van ideeën en onderzoeksresultaten heeft plaatsgevonden tussen beide partijen. Ook bij de uitvoering van het huidige onderzoeksproject nam en neemt communicatie een belangrijke plaats in (hoofdstuk 3.8). Vanuit het huidige onderzoeksproject werden bijdragen geleverd aan het populaire VEL & VANLA magazine ‘Natuurlijk in Balans’, waarvan 6 nummers zijn verschenen in een totale oplage van 18.500 exemplaren. Voorts werd een bijdrage geleverd aan het vaktijdschrift Bodem, waarin in het themanummer over duurzaam bodembeheer een artikel werd gepubliceerd getiteld ‘Een veranderde visie op bodemkwaliteit binnen de melkveehouderij: het VEL & VANLA Mineralenproject [De Goede e.a., 2002]. Resultaten van het bodembiologisch onderzoek werden ingebracht tijdens zogenaamde huiskamerbijeenkomsten, waarin boeren al dan niet met wetenschappers in kleine kring discussiëren. Tenslotte werd door de bodembiologen op lokatie een workshop georganiseerd, waarin boeren onderzoek konden

verrichten naar bodemdieren in grond van hun eigen bedrijf. Door de gerichte publiciteit heeft het VEL & VANLA Mineralenproject landelijke bekendheid gekregen en werden naar schatting meer dan 1500 boeren en 2000 overige geïnteresseerden bereikt.

SUMMARY

Sustainable application of cattle manure slurry in grassland soils

The project 'Sustainable application of cattle manure slurry in grassland soils' is part of the VEL & VANLA Nutrient project. The environmental co-operatives 'Vereniging Eastermars Lânsdouwe' (VEL) and 'Vereniging Agraricultural Natuur en Landschapsbeheer Achtkarspelen' (VANLA) from the province of Friesland aim to reach an ecologically sound reduction of emissions of nitrogen and fertilizer use. This is restricted by the preconditions set by the characteristic small-scale northern Frisian hedgerow landscape. Together with the national authorities the farmers have reached some specific agreements [Dubbeldam, 2000]. They are allowed to extend the period of manure slurry application in autumn with 14 days. They have developed a specific machine for the application of manure slurry. Furthermore, some farmers use additives, such as Euro mest-mix® (MX) and Effective Micro-organisms® (EM) to improve the quality of the manure slurry. Farmers that use MX manure slurry were temporary permitted to apply the manure slurry above-ground instead of having to inject the manure slurry into the soil. In return these farmers were required to reach the reduction of nitrogen emissions as set by the national standards earlier than other farmers in The Netherlands.
In co-operation with scientists from Wageningen University & Research a management model was developed to reach an ecologically sound reduction of ammonia and nitrate losses. The diet of the dairy cattle has been adjusted, the use of supplements and inorganic fertilizers has been reduced, and the feeds have been harvested at a more mature stage. These measures resulted in the production of a manure slurry with different chemical and microbiologically properties that probably will, when applied to the land, affect soil nutrient dynamics and soil life. The combination of adjustments is supposed to reduce emissions of nutrients and to improve nutrient availability for the plant.

This report describes the first two years of a four-year research program, in which consequences of the VEL & VANLA method for the compartments manure slurry and soil life are investigated.

Chemical characterization of manure slurry
In chapter 3.1 a method is described to measure *in situ* the composition of manure slurry, with special attention to ammonium. When ammonium evaporates as ammonia it contributes to the emission of nitrogen. The Donnan Membrane Technique (DMT) was adjusted such that concentrations of free cations as NH_4^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Na^+ and K^+ could be determined in manure slurry. The DMT-manure cell can be applied *in situ* in the manure slurry cellar. The cell consists of 3 Perspex rings that are separated by two negatively charged membranes (figure 4). The compartment enclosed by the two membranes is the acceptor compartment, which is filled with a solution containing similar concentrations of cations as present in the manure slurry. When the DMT-manure cell is placed in manure slurry exchange of free cations will take place through the negatively charged membranes until equilibrium between the manure slurry and the solution in the acceptor compartment is reached. Then a sample is taken from the acceptor compartment that is analyzed for ammonium and other free cations in the laboratory. Chapter 3.1 describes the first results of measurements using the DMT-manure cell. These results show that the DMT-manure cell can be used to determine free nutrient concentrations including ammonium in manure slurry.

Effects of dairy cow rations on bacterial community in manure
The VEL & VANLA Nutrient project intended to produce cow manure with a better quality by specific adjustments of the cattle rations. A higher C to N_{total} ratio and a lower $N_{mineral}$ to $N_{organic}$ ratio characterize a manure slurry of better quality. We investigated whether the adjustments of cattle

rations affected the composition of the microbial community present in the manure. Micro-organisms play a key role in the decomposition of organic matter and in the mineralization of organic nitrogen as ammonium and nitrate. At an experimental farm 16 dairy cows were fed in couples with 8 different rations. The rations differed in crude protein and energy content (crude protein content: 110 and 200 g/kg dm; Energy content measured as VEM ('Verterings Eenheid Melk' a Dutch standard) =750 and 975). Each couple of cows was fed for 6 weeks on one of the eight rations. Then fresh manure was collected and the total number of bacteria, bacterial biomass, bacterial growth rate (thymidine and leucine incorporation) and bacterial diversity (DGGE profiles) was measured.
The rations had no effect on the taxa composition of the bacterial community in the fresh manure (figure 9). However, the relative abundance of various bacterial taxa was affected and these changes mainly depended on the protein content of the ration (figure 10). The manure produced on a ration that resembled a conventional ration, i.e. rich in crude protein and low in crude fibers (and thus low in energy) had a high bacterial biomass (5000 $\mu g\ C\ g^{-1}$), but a relatively low bacterial activity (figures 13 and 14). As such rations (e.g. protein rich ration on young grass silage) are rich in proteins and highly decomposable carbon sources (Table 3), the microbial community will be rather inactive due to C limitation. Typical VEL & VANLA rations have a relatively low crude protein level and are rich in crude fibers. The manure produced on such a ration (protein poor ration on old grass silage) had a somewhat lower bacterial biomass (3000 $\mu g\ C\ g^{-1}$), whereas the bacterial activity had increased. Such bacterial community was not C-limited and received just enough nitrogen for biomass production (C to N ratio manure = 15-20). This resulted in manure with a very low $N_{mineral}$ content.
It was concluded that the adjustments in the rations resulted in changes in the bacterial community in the cows' intestine. These changes were mainly due to the protein content of the ration. It is possible that a reduction in the protein content resulted in relative shifts within the bacterial community towards taxa with relatively high N-efficiencies. However, such hypothesis deserves more research.

Effects of cow rations on ammonia volatilization from manure slurry

The amount of nitrogen that can volatilize as ammonia from manure slurry is mainly affected by the composition of the manure, which is dependent on cow rations. For this experiment we used similar manures as discussed in the paragraph above, however, urine was added to the manure to create manure slurry. The rations that contain more fibres and less crude protein, i.e. the VEL & VANLA approach, are supposed to create manure with lower ammonia volatilization. *In situ* measurements to determine free nutrient concentrations and ammonia volatilization in stored manure slurry were executed. Manure slurries produced with rations containing high amounts of crude protein contained more salt and had a higher pH (table 4). These manure slurries also contained a larger fraction of free ammonium (table 5). As expected ammonia volatilization from these manure slurries was significantly larger than volatilization from manure slurrie produced on diets with a much lower crude protein content. Also the energy content (= content of difficult decomposable fibres) of the ration affected ammonia volatilization. Manure slurry produced from a low energy ration had increased ammonia volatilization.
We can conclude that adjustments in cow rations according to the VEL & VANLA Nutrient project guidelines resulted in manure slurries with lower ammonium concentrations and lower ammonia volatilization.

Recovery of supplied bacteria in manure

Within dairy farming systems several additives are used to increase manure quality. One of these additives is Effective Micro-organisms (EM), which is used by a certain group of the farmers united in the co-operatives VEL & VANLA. Using EM is supposed to have several positive effects, for instance a reduction in ammonia volatilization from the manure slurry. In this experi-

ment, bacterial diversity of the EM-mixtures and the persistence of EM-bacteria in manure were determined using DGGE. The producer of EM advises to apply EM in combination with Agri-mest, therefore Agri-mest was included in the experimental design as well.
Two EM -stocks had low similarity and contained 12 or 15 bacteria taxa (figure 16). EM-Stock needs to be incubated with a feeding solution (molasse) before it can be used in manure slurry. Activation of the EM-stocks to an EM-active solution resulted sometimes in an increase in the number of bacteria taxa (maximum 35 taxa; figure 16). Comparable to the EM-stocks, differences between 2 EM-active solutions were considerable, indicating a lack of consistency within the contents of such cultures. The addition of an EM-active solution to manure slurry did not result in significant changes in the bacterial community present in the manure slurry (figure 17), independent of the presence of Agri-mest. Bacteria-taxa that were only present in the EM-active solution were not recovered in the manure slurry. Apparently, survival of the added bacteria to the manure slurry is low and/or abundances are below the detection limit of the used method.

Effects of EM on ammonia volatilization and grass production
Ammonia volatilization was not affected by the use of EM. On the other hand, the additive Euro mest-mix (MX) caused under specific conditions a statistically significant decrease (38%) in ammonia volatilization. Effects of MX were only present in a non-mixed manure slurry kept at low temperatures (4 ^{o}C) (figure 26). The application of Agri-mest also resulted in a similar decrease in ammonia volatilization, however this decrease was marginal significant. At higher temperatures and under mixing conditions no effects of the additives EM, MX and Agri-mest on ammonia volatilization were evident.
In accordance with the above-mentioned results, no effects of the application of EM on biomass production and nitrogen uptake of *Lolium perenne* were found (figure 24, 25). A small effect of Agri-mest was present: plants had taken up less nitrogen when Agri-mest had been added to the manure (figure 25).

Effects of manure application method on soil faunal communities
In the VEL & VANLA nutrient project farmers want to limit the external inputs of nitrogen (fertilizer) to their soils and want to maximize nutrient uptake from manure slurry. Also, to limit nutrient losses they produce a manure slurry with a lower $N_{mineral}$ to $N_{organic}$ ratio. Decomposition of manure and mineralization of nitrogen from organic material present in the manure are biological processes and are therefore dependent on the presence of a well-developed soil life. Many farmers are convinced that slit injection harms soil life. According to them, Dutch legislation that requires farmers to inject manure slurry, conflicts with the development of a healthy soil life community.
At an experimental field, effects of slit injection on certain soil animals, namely earthworms, enchytraeids, mites, springtails and nematodes were investigated in the spring of 2002 and the summer of 2003. In this experiment manure slurry to which the additive Euro mest-mix was added, was used. Firstly, effects of slit injection were compared with spreading of the manure slurry aboveground. Secondly, effects of cutting the slit and presence/absence of manure slurry were studied within the slit injection treatment. No effects of slit injection on population numbers of enchytraeids, mites and springtails (figure 28-30) were found. Also, no effects on the species composition of mites and springtails were evident. Within the nematode community slit injection caused an increase in the relative fraction of ‘enrichment opportunistic species’ (indicators of nutrient enrichment) compared to the treatment spreading of manure slurry aboveground. Cutting the grass sod resulted in a decrease in the number of endoparasitic plant feeding nematodes in the soil. Apparently, cutting the sod affected grass development, resulting in a movement of free-living endoparasitic plant feeding nematodes into the grass roots. Slit injection without EM application resulted in a significant decrease of total earthworm numbers (figure 34). However, these effects were only significant in the wet spring of 2002. In the summer of 2003, under very dry

weather conditions, earthworm abundances were low and most of the found earthworms were inactive. Manure slurry negatively affected earthworms that live at the soil surface (epigeic worms; figure 36). Especially the fraction of juvenile *Lumbricus rubellus* earthworms decreased significantly after the spreading of manure slurry (independent of placement). The results of the performed study reveal more subtle effects of slit injection on earthworms than an earlier study by De Goede et al. [2003].

Communication

Farmers united in the co-operatives VEL & VANLA nutrient project requested the performed scientific studies. One of the main characteristics of this mineral project is the intensive exchange of ideas and information between farmers and researchers. During the executing of the research projects described in this report communication with farmers and other researchers was an important activity. This project contributed to the contents of the popular VEL & VANLA magazine 'Natuurlijk in Balans'. Of this magazine 6 theme numbers appeared and 18.500 copies were circulated in total. In a theme number of the magazine 'Bodem' on sustainable soil management an article called 'Een veranderde visie op bodemkwaliteit binnen de melkveehouderij: het VEL & VANLA mineralenproject [De Goede et al., 2002] was published. Results of the soil biological studies were discussed during get togethers at farms. Farmers attended these meetings, and sometimes scientists were present as well. Also a workshop was organized by the soil biologists at a farm in Friesland. At this workshop farmers studied soil animals in soil of their own farm. By well-planned publicity the VEL & VANLA nutrient project has gained national publicity and has reached more than 1500 farmers and 2000 other interested persons.

HOOFDSTUK 1

INLEIDING

VEL & VANLA Mineralenproject

Het project "Verantwoorde toepassing van rundermest in graslandbodems" maakt onderdeel uit van het VEL & VANLA Mineralenproject. VEL (Vereniging Eastermars Lânsdouwe) en VANLA (Vereniging Agrarisch Natuur- en Landschapsbeheer Achtkarspelen) zijn twee Friese milieucoöperaties in de omgeving van Oostermeer/Achtkarspelen die de doelstellingen ten aanzien van emissies van stikstof en andere meststoffen op een milieuvriendelijke manier willen realiseren. Zij houden daarbij rekening met de karakteristieke eigenschappen van het Noord-Friese woudenlandschap. In overleg met de overheid is tot een aantal gebiedsspecifieke afspraken gekomen [Dubbeldam, 2000]. In het kader van het VEL & VANLA Mineralenproject mogen de boeren van de coöperaties in de herfst op de hoge zandgronden 14 dagen langer mest uitrijden dan elders in Nederland, omdat het gras hier langer doorgroeit en dus langer meststoffen opneemt. Er is een speciale 'gebiedsvriendelijke' machine ontwikkeld voor het uitrijden van mest. Er wordt geëxperimenteerd met verschillende mesttoevoegmiddelen, zoals Euro mest-mix (MX, dat geacht wordt mest te composteren) en Effectieve Micro-organismen (EM). Boeren die gebruik maken van Euro mest-mixmest hebben tijdelijk toestemming gekregen om de mest bovengronds uit te rijden in plaats van deze te moeten injecteren. Als tegenprestatie moeten de deelnemende boeren versneld voldoen aan de door de overheid gestelde normen van het mestbeleid.

Kansen voor reductie van N-emissies

De agrarische sector is volgens nationale en internationale wetgeving verplicht om per 2003 te voldoen aan vastgestelde eind- verliesnormen voor stikstof van 180 kg ha^{-1}. De afgelopen jaren is bij proefboerderijonderzoek (De Marke, AP Minderhoudhoeve, Ossekampen) ervaren dat voor een optimaal resultaat een geïntegreerde bedrijfsvoering nodig is. In het VEL & VANLA Mineralenproject werd als uitgangspunt gekozen dat het terugbrengen van deze verliezen en overschotten het best kan worden gerealiseerd door een bedrijfsbenadering, waarin de deelsystemen bodem, plant, dier en mest optimaal op elkaar worden afgestemd. Analyse van bedrijfsgegevens van melkveehouders uit het onderzoeksgebied over de jaren 1995-1996, dat wil zeggen voorafgaand aan de start van het VEL & VANLA Mineralenproject, heeft aangetoond dat er vooral winst geboekt kon worden door een verbetering van de N-benutting in de bodem (tabel 1). Het overgrote deel (gemiddeld meer dan 80%) van de stikstof in het rantsoen van de koe komt terecht in de mest. Aangezien de stikstofbenutting door de bodem een grote spreiding (33-78%) vertoont, valt vooral hier winst te boeken.

Model van aanpak

Binnen het VEL & VANLA Mineralenproject werd het volgende model gehanteerd om een verbeterde stikstofbenutting door de bodem te realiseren. Door de kunstmest-N-gift geleidelijk af te bouwen en later te maaien wordt een ruwvoer (= zelfgeproduceerd diervoer) verkregen met een lager ruw-eiwit (RE) gehalte, een lagere energie-inhoud (VEM, voedereenheid melk) en een hoger ruw celstofgehalte. In combinatie met een aangepast eiwitgehalte van de bijvoeding zal een dergelijk rantsoen naar verwachting leiden tot de productie van dierlijke mest met een hogere C/N verhouding, een kleiner deel snel-vervluchtigende stikstof (d.w.z. een verhoging van de organisch gebonden N ten opzichte van de minerale N) en minder toxische producten. De werkhypothese van het huidige onderzoek is dat deze mest zal leiden tot een lagere ammoniakvervluchtiging en een positief effect zal hebben op het bodemleven, waardoor de bodembenutting van stikstof wordt verhoogd. Naar verwachting zal dankzij deze betere benutting de productie per hectare ondanks de lagere kunstmestgift op peil blijven.

Tabel 1. Stikstofstromen en –efficiënties bij VEL & VANLA melkveehouderijbedrijven (n=93) tussen 1 mei 1995 en 30 april 1996.

	Minimum	Gemiddelde	Maximum
N stroom (kg ha^{-1})			
Afgevoerd product	31	63	93
Krachtvoer	31	97	197
Kunstmest	154	292	478
Zelf geproduceerd diervoer	182	280	434
Drijfmest	195	314	533
Overschot	162	326	560
N-efficiëntie (%)			
Koe[1]	8	17	24
Bodem[2]	33	46	78
Bedrijf[3]	10	16	28

Bron: [Verhoeven e.a., 2003]
1. Afgevoerd product als percentage van (krachtvoer + zelf geproduceerd diervoer)
2. Zelf geproduceerd diervoer als percentage van (kunstmest + drijfmest)
3. Afgevoerd product als percentage van (kunstmest + krachtvoer)

Rantsoensamenstelling en mestkwaliteit

Uitgangspunt is dus dat door aanpassing van de samenstelling van het rantsoen van de koe de kwaliteit van de mest kan worden beïnvloed en dat toepassing van deze mest leidt tot fysische, chemische en biologische veranderingen in de bodem, die bijdragen aan verminderde emissies van nutriënten en een efficiëntere nutriëntenbenutting door de plant. Onderzoek heeft aangetoond dat de aanpassingen in het management ten aanzien van grasoogst en krachtvoergebruik inderdaad tot een verlaging van het ruw eiwitgehalte in het rantsoen hebben geleid. In de periode 1998/1999 - 1999/2000 nam het gehalte aan ruw eiwit in het rantsoen af van 170 tot 159 g RE kg^{-1} [Verhoeven e.a., 2003]. Als streefwaarde wordt een RE van ≤150 g RE kg^{-1} gehanteerd binnen het VEL & VANLA Mineralenproject. Het gehalte aan ruw celstof is tegen de verwachting in niet gestegen over de periode 1997 – 2001 [Verhoeven e.a., 2003]. Deze veranderingen in rantsoensamenstelling leidden tot een toename van de C/N ratio in de mest van 7.0 in 1989 tot 8.1 in 2002. Bovendien nam over deze periode de fractie minerale stikstof in de mest af van 53% naar 42% en steeg het aantal bedrijven waarvan de mest minder dan 50% $N_{mineraal}$ bevatte van 29% naar 93% [Verhoeven e.a., 2003]. Deze veranderingen in de samenstelling van de mest zouden moeten leiden tot een aanzienlijk verminderde ammoniakemissie [Erisman, 2000].

Mest, mestkwaliteit en ammoniakemissie

Het onderzoek tot nu toe heeft aangetoond dat aanpassingen in de samenstelling van het rantsoen hebben geleid tot zodanige veranderingen in de kwalitatieve samenstelling van de mest dat verondersteld kan worden dat dergelijke mest zal leiden tot een verminderde ammoniakemissie. In een veldproef in het voorjaar van 2003, die geen deel uitmaakte van het huidige SKB-onderzoek, werd dit inderdaad aangetoond. De totale ammoniakemissie blijkt met circa 60% te zijn verminderd [Huijsmans e.a. in voorber.]. In het voorliggende rapport is onderzoek verricht om deze hypothese onder gecontroleerde omstandigheden te toetsen. Allereerst werd een methode ontwikkeld waarmee het mogelijk werd om *in situ* de kwalitatieve samenstelling van de drijfmest, met name de vrije ammoniumconcentratie, te bepalen. Hiervoor is een variant van de Donnan Membraan Techniek (DMT) ontwikkeld die het mogelijk moet maken om vrije kationen, zoals NH_4^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Na^+ en K^+ concentraties, in de waterfase van de drijfmest te bepalen. In het huidige rapport wordt deze variant van de DMT beschreven, worden testresultaten gepresen-

teerd (paragraaf 3.1) en worden meetresultaten in mesten van uiteenlopende kwaliteit, verkregen door specifieke aanpassingen in het rantsoen van de koe, gepresenteerd en vergeleken met de ammoniakemissie van deze mesten (paragraaf 3.3).
Daarnaast wordt onderzocht of aanpassing van het rantsoen van de koe leidt tot veranderingen in de microbiële gemeenschap in de mest (paragraaf 3.2).

Mestadditieven en bovengrondse mestverspreiding
Binnen het VEL & VANLA Mineralenproject wordt via aanpassingen in het rantsoen van de koe gestuurd op de productie van een 'verbeterde' kwaliteit mest. Een groot aantal boeren, zowel binnen als buiten het Mineralenproject, past hulpmiddelen toe om naast deze rantsoenaanpassingen de kwaliteit van de mest te verbeteren. Binnen het VEL & VANLA gebied is dat de toevoeging van Effectieve Micro-organismen (EM) en Euro mest-mix (MX) aan de mest. Effectieve Micro-organismen en Euro mest-mix zouden een positieve werking hebben ten aanzien van de vermindering van ammoniakemissie en het vóórkomen van gifstoffen (zoals indol, fenol, e.d.) in mest. Hun werking is echter op zijn minst omstreden. Eén van de gevolgen van de geclaimde mestkwaliteitsverbetering door dergelijke toevoegmiddelen is dat boeren afzien (of willen afzien) van zogenaamde emissiearme uitrijdtechnieken, zoals zodenbemesting of mestinjectie, en de drijfmest bovengronds willen verspreiden. Er wordt de voorkeur aan bovengrondse verspreiding gegeven, omdat dit, in tegenstelling tot zodenbemesting en mestinjectie, niet leidt tot beschadiging van de grasmat en een geringere bodemverdichting geeft. Bovendien zouden negatieve effecten op het bodemleven worden voorkomen. Het VEL & VANLA Mineralenproject streeft naar de productie van drijfmest, waarin de stikstof vooral organisch gebonden aanwezig is en naar een verlaging van de kunstmestgift (minerale stikstof). Daarom is een goed ontwikkelde bodemlevensgemeenschap van groot belang, omdat de decompositie van mest en de mineralisatie van stikstof uit de organisch gebonden fractie biologische processen zijn. Bovengrondse mesttoediening is echter in strijd met de wet en heeft geleid tot een aantal strafzaken. De afwikkeling hiervan verloopt moeizaam door het ontbreken van acceptabele wetenschappelijke onderzoeksresultaten.
In het huidige rapport is onderzocht of het toevoegen van Effectieve Micro-organismen (EM) leidt tot:
- veranderingen in de samenstelling van de microbiële gemeenschap in de mest (paragraaf 3.4);
- verhoging van de gewasopbrengst (paragraaf 3.5);
- vermindering van de ammoniakemissie (paragraaf 3.6).

Daarnaast is onderzocht welke gevolgen mestinjectie, in vergelijking met bovengrondse mestverspreiding, heeft op het voorkomen van een aantal sleutelgroepen van bodemdieren, nl. regenwormen, springstaarten, mijten en nematoden (paragraaf 3.7).

Kennisoverdracht: contacten tussen boeren en wetenschappers
Het wetenschappelijk onderzoek binnen het VEL & VANLA Mineralenproject werd geïnitieerd door de boeren van de milieucoöperaties. Kenmerkend voor het project is dat er vanaf de start een intensieve uitwisseling van ideeën en onderzoeksresultaten heeft plaatsgevonden tussen beide partijen. Ook bij de uitvoering van het huidige onderzoeksproject neemt communicatie een belangrijke plaats in (paragraaf 3.8).

Onderzoek in fase twee van het project
Het huidige onderzoeksverslag beschrijft de resultaten van de eerste twee jaar van een vierjarig onderzoeksproject. In de tweede fase wordt onderzoek verricht naar de werking en werkingsmechanismen van mesttoevoegmiddelen die hun werking zouden ontlenen aan in de preparaten aanwezige kleimineralen (MX) en wordt de N-dynamiek onderzocht in bodems die worden bemest met drijfmesten van uiteenlopende kwaliteit.

Bij de afsluiting van het gehele project verwachten wij duidelijkheid te kunnen geven over de waarde van mestadditieven en de effecten van mestinjectie op het bodemleven. Tevens voorzien wij een bijdrage te kunnen leveren aan een protocol voor een optimaal mestgebruik en aan de ontwikkeling van instrumenten voor de bepaling van de kwaliteit van zowel de mest als de graslandbodem op melkveehouderijbedrijven.

HOOFDSTUK 2

WERKZAAMHEDEN

2.1 Methode voor chemische karakterisering van drijfmest

Materiaal en methoden behorend bij dit onderzoek staan beschreven in hoofdstuk 3.1 van de Resultaten.

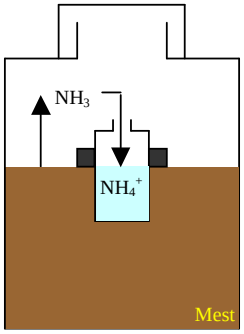
2.2 Invloed van rantsoensamenstelling op de microbiële samenstelling in mest

Voor dit project werd mest verzameld van koeien die werden gevoerd met rantsoenen die gekenmerkt werden door een extreem ruw eiwit- en energieniveau (ruw eiwit ofwel RE: 110 en 200 g/kg ds; Voeder Eenheid Melk ofwel VEM: 750 en 975). Alle vier de combinaties van ruw eiwit en energieniveau werden gerealiseerd door uitgekiende combinaties van ruwvoer (graskuil, snijmais, stro) en krachtvoer. Elk van deze vier rantsoenen werd op twee verschillende manieren gerealiseerd, hetgeen uiteindelijk resulteerde in 8 verschillende rantsoenen (zie tabel 3). In de proef zijn 16 koeien 6 weken met 8 verschillende rantsoenen gevoerd. De koeien waren droogstaande Holsteiners, die per rantsoen in koppels van twee dieren werden gehouden. Vlak voor het einde van de proef werd van elke koe 5 liter mest zonder urine verzameld (rechtstreeks uit de koe). In totaal hadden we 16 mestmonsters (1 per koe). De monsters werden koel bewaard tot nadere analyse.
In de mest werd 1 dag na bemonstering het aantal bacteriën bepaald [Bloem e.a., 1995] en is de bacteriële groeisnelheid bepaald door middel van thymidine en leucine-inbouw in bacterieel DNA en eiwit [Michel en Bloem, 1993]. Ook is het droge stofgehalte en de chemische samenstelling (koolstof, stikstof) van de mest bepaald. Voor het bepalen van de bacteriële diversiteit in de mestmonsters werd een DNA-extractie uitgevoerd met behulp van een FastDNA® SPIN Kit voor grond. Na vermenigvuldiging van het bacteriële DNA uit de mest door middel van PCR en scheiding van de verschillende soorten DNA door middel van denaturatie gradiënt gel electroforese (DGGE) werd met behulp van de gel-analyse software GELCOMPAR II het aantal DNA-banden in de EM- en mestmonsters, en de similariteit tussen de verschillende EM- en mestmonsters bepaald [Dilly e.a., in druk].

2.3 Invloed van rantsoensamenstelling op de ammoniakvervluchtiging in mest

De vrije nutriëntconcentraties in de drijfmest werden bepaald met behulp van de DMT-manure cel. In paragraaf 2.2 en 3.2 wordt detailinformatie gegeven over de gevolgde proefopzet.

Voor de bepaling van de ammoniakemissie werden per mestsoort 4 plastic potten met elk 0.5 kg mest gevuld. In de mest was een flesje met zuur geplaatst (3.2 M H_2SO_4; zie figuur 1 en paragraaf 2.6). Ammoniak dat uit de mest vervluchtigt, wordt opgenomen door het zuur en omgezet in ammonium (NH_4^+). Met bepaalde regelmaat werd het flesje met zuur vervangen en chemisch geanalyseerd (na verdunning tot 0.8



M H_2SO_4). De potten werden weggezet bij een temperatuur van 12 °C. Het experiment heeft een maand geduurd. Tijdens het experiment werd de mest niet geroerd.

Fig. 1. Overzicht opstelling.

2.4 Overleving van toegevoegde bacteriën in mest

Voor het vergelijken van EM-stocks (**onderzoeksvraag 1,** zie hoofdstuk 3.4) hebben wij onze eigen stock (gekregen van EM-leverancier Agriton, Industriestraat 1-B, 8391 AG Noordwolde Fr.) vergeleken met een stock van een vertegenwoordiger uit Friesland.
Voor de beantwoording van **onderzoeksvraag 2** werd een EM-Aktiefoplossing gemaakt door in een vergistingsvat 15 liter water, 0.75 liter EM-Stock en 0.75 liter melasse te mengen en dit mengsel vervolgens 7 dagen bij 22 ^{o}C te incuberen. Dit leverde geheel, volgens het protocol van Agriton, een vloeistof op die direct klaar is voor toepassing. Daarnaast hebben we monsters van een EM-Aktiefoplossing gebruikt die waren gemaakt door de vertegenwoordiger uit Friesland.
Voor het enten van de mest (**onderzoeksvraag 3**) hebben we de EM-Aktiefoplossing gebruikt die wij zelf hadden vervaardigd. Het protocol van de leverancier adviseert om tezamen met de EM-Aktiefoplossing ook het product Agri-mest (bestaande uit Agri-mest vloeibaar en Agri-mest mineraal) toe te dienen. De samenstelling van het product Agri-mest is onbekend, maar toevoeging aan mest heeft volgens Agriton onder andere tot gevolg dat de mest reukvrijer tot reukarmer en van een homogenere samenstelling is. Daarnaast treedt er op de mest geen koekvorming op en worden stikstofverliezen beperkt door mogelijke ammoniakbinding. Aangezien de boeren in het VEL & VANLA Mineralenproject overwegen Agri-mest te gaan gebruiken, hebben we besloten ook dit product op te nemen in het experiment. Hierdoor bestond het experiment uit vier behandelingen: +EM+Agri-mest, +EM-Agri-mest, -EM+Agri-mest, -EM-Agri-mest (controle). Voor iedere behandeling werden 4 emmers met elk 10 liter mest gevuld. Aan de mest in de emmers werd, afhankelijk van de behandeling, 2 ml EM-Aktief oplossing en/of 0.1 ml Agri-mest vloeibaar + 0.2 g Agri-mest mineraal toegevoegd. Als controle hebben we aan de -EM en -Agri-mestbehandelingen eenzelfde volume water toegevoegd. De mest was afkomstig van maatschap De Jong-Otten, een bedrijf dat deelneemt aan het VEL & VANLA Mineralenproject. Agri-mest werd 1 week voor de EM-Aktief oplossing toegevoegd waarna de mest werd opgeslagen in een koude kamer bij 4 ^{o}C. Eén dag en 42 dagen na het toevoegen van de EM-Aktiefoplossing werden er monsters van de mest genomen voor DNA-analyse. Er is gekozen voor een incubatieperiode van zes weken, omdat volgens de leverancier van EM de mest zes weken met de toegevoegde EM moet fermenteren alvorens de mest geschikt is voor gebruik.
Voor het bepalen van de bacteriële diversiteit in de EM-stockoplossingen, in de EM-Aktiefoplossingen en in de geënte mest na 6 weken incubatie, werd een DNA-extractie uitgevoerd met behulp van een FastDNA® SPIN Kit voor grond. Na vermenigvuldiging van het bacteriële DNA uit de mest door middel van PCR en scheiding van de verschillende soorten DNA door middel van denaturatie gradiënt gel electroforese (DGGE) werd met behulp van de gel-analyse software GELCOMPAR II het aantal DNA-banden in de EM- en mestmonsters, en de similariteit tussen de verschillende EM- en mestmonsters bepaald [Dilly e.a., in druk].
Voor het bepalen van de chemische samenstelling van de mest (**onderzoeksvraag 4**) zijn op de aanvangsdag en na 6 weken, monsters genomen van de mest in elk van de 16 emmers. Deze

zijn geanalyseerd op droge stofgehalte, pH, de totale hoeveelheid C en N, en de verhouding mineraal-N/organische-N.

2.5 Effect van EM-mest op grasgroei

Met behulp van de 6 weken oude mest (uit paragraaf 2.4) werd een potproef met Engels raaigras (*Lolium perenne*) uitgevoerd (**onderzoeksvraag 5** in paragraaf 3.4). In de potproef werden voor elke behandeling 3 potten met grond gevuld. De grond was afkomstig van hetzelfde bedrijf als de mest. Naast de 4 drijfmestbehandelingen (+EM+Agri-mest, +EM-Agri-mest, -EM +Agri-mest, en -EM-Agri-mest) waren er een controle (3 potten met alleen grond) en 2 kunstmest (KAS) behandelingen (lage en hoge dosering, respectievelijk 0.135 en 0.270 g N/pot; van elk 3 potten). De potten werden gevuld met 6 kilo grond (per pot). De grond bevatte 6.6 mg Nmineraal/kg droge grond bij de start van het experiment. Door de bovenlaag van deze grond werd een hoeveelheid organische mest gemengd, vergelijkbaar met een bemesting van 20 ton versgewicht/ha. Dit kwam overeen met een bemesting van 2.4 ± 0.2 mg N per pot. De potproef werd uitgevoerd in een kas met kunstlicht (16 uur dag/ 8 uur nacht) en een temperatuur van 20°C. Het vochtgehalte van de grond werd op 60% van de vloeigrens gehouden. Direct na het vullen van de potten werd in elke pot zes gram Engels raaigras gezaaid. De eerste snede van het gras vond plaats na 21 dagen; de tweede snede (einde van het experiment) vond plaats 55 dagen na de start van het experiment.

2.6 Invloed van toevoegmiddelen op de ammoniakemissie uit mest

Materiaal en methode

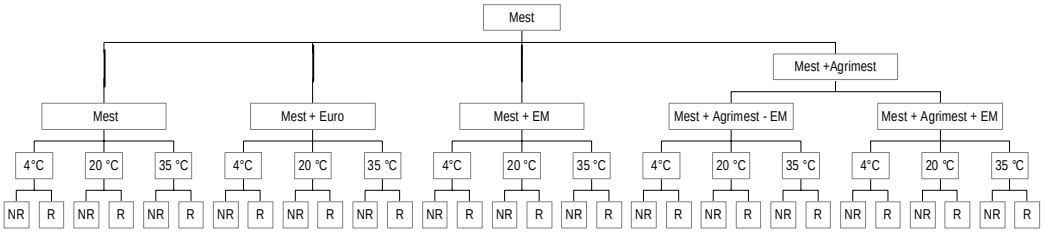
Een beschrijving van de voorbehandeling van de mesten is gegeven in paragraaf 2.4.

Macro- en micro-nutriënten in drijfmest

Allereerst werd onderzocht of toepassing van mest-additieven invloed heeft op de mestsamenstelling, in het bijzonder voor de macro-nutriënten NH_4^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} en de micro-nutriënten Cu^{2+} en Zn^{2+}. Hiervoor werd aan drijfmest respectievelijk Euro mest-mix (MX, bevat een pH regulator, sterk adsorberende kleimineralen en culturen van micro-organismen), Agri-mest (A, bestaande uit Agri-mest mineraal en Agri-mest vloeibaar), Effectieve Micro-organismen (EM), of Agri-mest + EM toegevoegd. Mest waaraan niets was toegevoegd werd meegenomen als controle. De proef werd uitgevoerd bij kamertemperatuur. Dezelfde mest en een aantal additieven werden ook gebruikt in het onderzoek naar de overleving van toegevoegde micro-organismen in mest (paragraaf 3.4).

Ammoniakvervluchtiging

Vóór de ammoniakvervluchtigingsproef werd ingezet werd de drijfmest eerst gehomogeniseerd en vervolgens gelijkmatig verdeeld over verschillende emmers, waarna al dan niet het additief Agri-mest (Agri-mest mineraal + Agri-mest vloeibaar) was toegevoegd. Vervolgens werden de emmers 1 week weggezet bij 4 °C. Hierna werden al dan niet de andere additieven (Euro mest-mix, Effectieve Micro-organismen (EM)) bij de mest gevoegd (zie figuur 2).



Eur o= Euro mest-mix; EM = Effectieve microörganismen; R = roeren; NR = niet roeren.

Fig. 2. Schematisch overzicht van de mesttoevoegmiddelenbehandelingen binnen het ammoniakvervluchtigingsexperiment.

Vervolgens werden plastic potten (wide neck bottle square) gevuld met de verschillende mesttypen (± 0,5 kg elk). In de pot werd een flesje geplaatst dat was gevuld met zuur (3.2 M H_2SO_4; zie figuur 1). Om het flesje zat een drijver, zodat het flesje halfweg in de mest bleef drijven. De plastic pot werd vervolgens afgesloten met een schroefdop (LDPE) en weggezet bij respectievelijk 4, 20 of 35 °C. De ammoniak (NH_3) die vrijkomt uit de mest, wordt door het zuur omgezet in ammonium (NH_4^+). Door vervolgens de ammoniumconcentratie te meten kan bepaald worden hoeveel ammoniak er vervluchtigt uit de mest. Door op bepaalde tijden het flesje te vervangen kon de ammoniakvervluchtiging als functie van de tijd worden gevolgd. Ook is onderzocht wat de invloed is van het mixen van mest op de ammoniakvervluchtiging. Hiervoor werd de mest in een selectie van de potten regelmatig geroerd met behulp van een bovenroerder. De proef werd in triplo uitgevoerd.

2.7 Effecten van mestaanwendingsmethodiek op de samenstelling van de bodemfauna in grasland

Dit experiment is uitgevoerd op een proefveld gelegen in Drogeham, Friesland. Dit proefveld werd in 1999 aangelegd om de effecten van mestaanwendingsmethoden en mestadditieven (Euro mest-mix (MX), EM en Fir) te bestuderen. In onze studie hebben we plots geselecteerd die bemest werden met mest, waaraan het additief Euro mest-mix was toegevoegd. Het bedrijf in Drogeham, waar het proefveld was gelegen, gebruikt al jaren Euro mest-mix en verspreidde bovendien de drijfmest altijd bovengronds. Eerder onderzoek [De Goede e.a., 2003] heeft aangetoond dat hoge aantallen regenwormen aanwezig waren op dit bedrijf. Verwacht werd dat mogelijke effecten van mestinjectie op regenwormen en andere bodemorganismen daarom eerder zullen opvallen. Om mogelijke effecten van de bemesting en van de mechanische schade van elkaar te kunnen onderscheiden hebben we ook velden bemonsterd die wel verstoord, maar niet bemest werden (de graszode werd wel doorsneden met de zodenbemester, maar er werd geen drijfmest in de sleuven gespoten) of die wel verstoord werden, maar waarbij de drijfmest bovengronds werd verspreid. Om seizoenseffecten uit te sluiten hebben we het proefveld in het voorjaar van 2002 en in de zomer van 2003 bemonsterd. In maart/april/mei 2002 hebben we vlak vóór en nà de bemesting de microbiële activiteit (gemeten als bodemrespiratie) bepaald en nematoden, potwormen en regenwormen bemonsterd. In mei 2002 hebben we de effecten van de mestaanwendingsmethoden op mijten en springstaarten bepaald. In augustus/september 2003 hebben we nogmaals de effecten van de mestaanwendingsmethode op regenwormen aantallen en diversiteit bepaald. Voor beide bemonsteringsperioden geldt dat monsters 1 week vóór het bemesten, 1 week ernà en 4 of 5 weken nà de bemesting zijn genomen. Per behandeling waren 4 proefveldjes beschikbaar die elk werden bemonsterd. Voor de behandelingen “bovengrondse mestverspreiding zonder doorsnijding van de graszode” en “zodenbemesting” geldt dat twee van de vier herhalingen aanvullend werden behandeld met Effectieve Micro-organismen (EM). De EM-behandeling maakte geen deel uit van het experiment, maar bemonstering van deze veldjes was noodzakelijk om te kunnen beschikken over voldoende herhalingen. Voor de uitbreiding van het aantal te onderzoeken veldjes werd gekozen voor de EM-behandeling, omdat we veronderstelden dat EM geen effect zou hebben op de bodemfauna. Voorafgaand aan de statistische analyses werd allereerst onderzocht of een effect van de EM-gift aantoonbaar was. In afwezigheid van zo’n effect werden de behandelingen met en zonder EM-gift samengevoegd, waarna de eigenlijke statistische analyses werden uitgevoerd. Als een aantoonbaar effect van EM aanwezig was, zijn de herhalingen met en zonder EM-gift niet samengenomen.
Voor de nematodenbemonstering werden per proefveldje 20 steken met een gutsboor tot 10 cm diep genomen. Bij terugkomst in het laboratorium werden de monsters voorzichtig gehomogeniseerd en met behulp van een oostenbrinktrechter zijn de nematoden uit een submonster geëxtraheerd. Identificatie en indeling in trofische groepen vonden plaats volgens Bongers [1985 en 1990].

Voor het verzamelen van potwormen werden per proefveldje 2 monsters met een potwormenboor (diameter 5.8 cm) tot 10 cm diep genomen. Bij terugkomst in het laboratorium werden de potwormen via een aangepast O'Connor extractie-apparaat [O'Connor, 1955] uit deze grond verdreven en geteld.
Regenwormen werden door middel van handsortering uit de grond uit een gat van 20x20x20 cm verzameld. Anecique wormen (pendelaars) werden verzameld door over de bodem van het gat een verdunde formaline-oplossing (0.2 %) aan te brengen. Per proefveld zijn 2 gaten bemonsterd. De regenwormen zijn mee teruggenomen naar het laboratorium alwaar zowel de volwassen als juveniele wormen zijn geïdentificeerd.
Per proefveld zijn ook 2 grondmonsters (diameter 10 cm, 15 cm diep) genomen voor het verzamelen van regenwormcocons. Terug in het laboratorium zijn de cocons met behulp van water uit de grond gewassen.

HOOFDSTUK 3

RESULTATEN

3.1 Methode voor chemische karakterisering van drijfmest

Inleiding

Macro- en micronutriënten kunnen in verschillende vormen aanwezig zijn in mest. De vorm, waarin nutriënten voorkomen in mest, is van groot belang om inzicht te krijgen in de werking van mest op de bodem en dus ook om iets te kunnen zeggen over mestkwaliteit. Het doel van dit deelproject was de ontwikkeling van een variant van de DMT (Donnan Membraan Techniek) methode die al gebruikt wordt om de verschijningsvormen van nutriënten en toxische metalen in de bodem te meten. De voor dit deelproject ontwikkelde cel wordt DMT-manure cel genoemd. Met de DMT-manure cel kunnen *in situ* metingen worden verricht in mestopslagsystemen.

De kwaliteit van mest wordt niet alleen bepaald door de totaalgehaltes van de nutriënten, maar ook door de vorm waarin de nutriënten voorkomen. Zo kunnen de nutriënten gebonden voorkomen in mest (bijvoorbeeld aan organische stof), als neergeslagen zouten, maar ook als vrij geladen deeltjes. Deze geladen deeltjes worden ionen genoemd.
Met de DMT-manure cel kunnen de concentraties aan vrije positief geladen ionen (bijvoorbeeld de concentratie aan vrij ammonium) in de mest worden bepaald (zie figuur 3). In de cel vindt namelijk uitwisseling plaats van vrije positief geladen ionen over een negatief geladen membraan tussen mest en een bekende oplossing (acceptor). Negatief geladen ionen en gebonden ionen kunnen niet door het membraan. Na verloop van tijd zullen de vrije positief geladen ionen in de DMT-manure cel (acceptor) in evenwicht komen met de vrije positief geladen ionen in de mest.

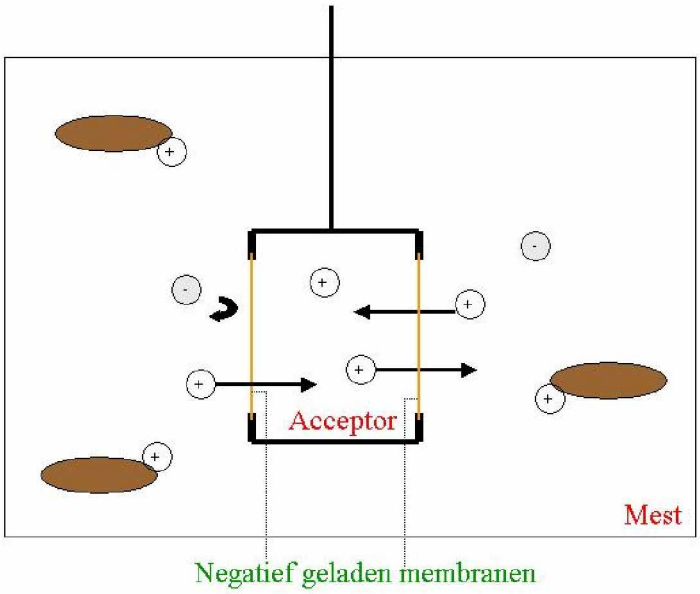


Fig. 3. Schematische weergave van het principe van de DMT-manure cel.

DMT-manure cel

De DMT-manure cel is opgebouwd uit 3 perspex ringen, die van elkaar gescheiden zijn door twee negatief geladen membranen (figuur 4). De middelste ring vormt hierbij het acceptor compartiment. Aan de bovenkant van het acceptor compartiment zitten een in- en een uitlaat. Het acceptor compartiment wordt gevuld met een oplossing, waarvan de samenstelling is gebaseerd op de gemiddelde K-, Ca-, Mg- en Na-gehalten van mest (verkregen uit literatuur). De acceptor-oplossing heeft een zoutsterkte van ca. 0.4 M. Bemonstering vindt plaats met behulp van een injectiespuit. Luer Locks worden gebruikt om het acceptor compartiment af te sluiten.

Fig. 4. Overzicht van DMT-manure cel. Links: de losse onderdelen, rechts: gehele cel.

Resultaten

Allereerst is de DMT-manure cel getest met behulp van in het laboratorium vervaardigde zoutoplossingen, waarvan de samenstelling exact bekend was. Tijdens deze testen werd vastgesteld dat het niet-rondpompen van de acceptor-oplossing nauwelijks van invloed was op de tijdsduur van de evenwichtsinstelling. Het transport van ionen over het membraan is de snelheidsbeperkende stap voor het instellen van het Donnan membraan-evenwicht. Binnen 7 dagen na de start van een DMT-experiment werd evenwicht bereikt. Aanvullende optimalisatietests toonden verder aan dat de zoutsterkte van de gekozen acceptor-oplossing goed overeenkwam met in de tests meegenomen mestmonsters.

Na deze vooronderzoek- en testfase was de DMT-manure cel gereed om *in situ* in drijfmest te worden toegepast. Daartoe werden metingen met de DMT-manure cel verricht binnen de volgende onderzoeken:

- Bufferende werking van mest op de verschijningsvormen waarin de ionen voorkomen (dit hoofdstuk);
- Invloed van rantsoensamenstelling op de verschijningsvormen waarin ionen voorkomen in de diverse mestsoorten (paragraaf 3.3);
- Invloed van mest-additieven op de verschijningsvormen waarin macro- en micro-nutriënten in drijfmest voorkomen (paragraaf 3.6).

Bepaling van de bufferende werking van mest en validatie DMT-manure cel

Inleiding

De DMT-manure cel is gebruikt om na te gaan wat de bufferende werking van mest is. De hypothese was dat de concentratie van vrije ionen in mest gebufferd wordt vanuit de vaste fase van de mest. Om de hypothese te testen zijn aan mest (mesttype HGJ; zie de paragrafen 3.2 en 3.3)

verschillende hoeveelheden water (Ultra Puur Water) toegevoegd (zie tabel 2). De gedachte hierachter is, dat de afname van de concentratie vrije kationen in de mest als gevolg van de verdunning met water wordt gecompenseerd door een afgifte van kationen uit het vaste gedeelte van de mest. Hierdoor ontstaat er een nieuw evenwicht tussen de 'vrije' kationen in oplossing en in de vaste fase, waarbij de totale hoeveelheid vrije kationen hoger zal zijn dan voor de verdunning. Aangezien de ionen die zijn gebonden in de vaste fase in overmaat aanwezig zijn, zal de (vrije) metaalconcentratie nagenoeg constant blijven.

Kalium is een nutriënt dat uitsluitend als vrij ion in oplossing voorkomt en dus niet gebonden wordt aan de mest, terwijl calcium een nutriënt is dat zowel vrij als ook gebonden aan organische stof in mest kan voorkomen.
De DMT-manure cel is een instrument dat uitermate geschikt is om de vrije metaalconcentraties te meten. De resultaten van de metingen aan Ca en K zouden dan ook uitsluitsel moeten geven over de praktische toepasbaarheid van de DMT-manure cel bij *in situ* metingen in drijfmest.

Tabel 2 Overzicht van de totale en vrije nutriëntgehaltes voor Kalium en Calcium, bij verschillende verhoudingen tussen drijfmest en water gemeten, met de DMT-manure cel ([K+]; [Ca2+]) en via een destructie (Totaal).

# Mest	# Water*	Kalium [mMol/l]		Calcium [mMol/l]	
[kg]	[kg]	Totaal	$[K^+]$	Totaal	$[Ca^{2+}]$
4	0	206	205	33	0.36
3.5	0.5	181	166	29	0.42
3	1	152	154	23	0.32
2	2	102	100	16	0.38
1	3	54	56	8	0.36

* Ultra Puur Water

Resultaten
De totale kaliumconcentratie nam, conform de verwachting, evenredig af met de afname in de verhouding mest/water (tabel 2). Ook de totale calciumconcentratie nam evenredig af met toenemende verdunning (tabel 2). De vrije calciumconcentratie in de mest bleef echter nagenoeg constant, wat goed de bufferende werking van mest weergeeft. Oftewel, bij een dunnere mest (sterker verdund) wordt de afname van de (vrije) nutriënten zoals Ca in mest gecompenseerd door het vrijkomen van nutriënten uit het vaste gedeelte van de mest. Aangezien planten alleen de vrije ionen kunnen opnemen is het van groot belang te weten met welke snelheid de vrije nutriënten beschikbaar kunnen komen in de bodem en dus ook in de mest.

Conclusie
De afname van de vrije nutriëntenconcentratie hangt sterk af van de mate waarin het nutriënt gebonden wordt in de mest. De DMT-manure cel blijkt uitstekend geschikt om deze vrije nutriëntenconcentraties in drijfmest te meten.

3.2 Invloed van rantsoensamenstelling op de microbiële samenstelling in mest

Inleiding
De microbiële samenstelling van drijfmest wordt grotendeels bepaald door de chemische samenstelling van de faeces en de urine. Bij een eiwitrijk en vezelarm voer zal de groei van microorganismen in de dikke darm van de koe, en dus ook in de faeces, C-beperkt zijn. Door de menging van urine en faeces in de drijfmestopslag ontstaat een milieu dat ongunstig is voor groei van anaërobe bacteriën vanwege de overmaat van N en tekort aan fermenteerbare koolhydraten. Door extracellulaire enzymen wordt ammoniak vrijgemaakt uit urine, hetgeen deels vervluchtigt.

Hiernaast worden eiwitten van gelyseerde bacteriën in de faeces en onverteerde plantenresten door extracellulaire proteasen gesplitst, waarbij giftige N-derivaten en vluchtige stankstoffen vrijkomen. Bij aanwezigheid van fermenteerbare koolhydraten in de drijfmest kan een deel van de stikstof in microbiële biomassa worden vastgelegd. Dit kan lagere stikstofverliezen tot gevolg hebben. Na toediening van deze mest aan de grond, is de bacteriële N relatief snel beschikbaar voor plantengroei. Opvallend is dat tot op heden geen gedetailleerde analyse van de microbiële samenstelling van faeces van koeien gepubliceerd is. Oudere waarnemingen over aantallen kweekbare bacteriën zijn veelal onvolledig en onbetrouwbaar. Zelfs zijn er geen betrouwbare gegevens bekend over de totale levende biomassa in runderdrijfmest.
Een van de doelen van het VEL & VANLA Mineralenproject is om via aanpassingen in het rantsoen van de koe een drijfmest te produceren met een lagere kans op ammoniakemissie en die na toepassing op het land bijdraagt aan een goede nutriëntenvoorziening van het gewas. Binnen het hier beschreven project wordt onderzocht welke gevolgen de aanpassing van het rantsoen heeft voor de chemische samenstelling van de mest en voor de samenstelling van de microbiële gemeenschap in de mest. De mest werd verzameld direct nadat het de koe had verlaten en voordat het kon worden gemengd met urine tot drijfmest. In paragraaf 3.3 wordt de ammoniakemissie van deze mest beschreven nadat het werd gemengd met urine tot drijfmest.

Eigenschappen van de rantsoenen

De onderzochte rantsoenen vormen ten aanzien van het eiwitgehalte en de energie-inhoud extremen die niet of nauwelijks in de praktijk van het VEL & VANLA Mineralenproject worden aangetroffen, maar die wel inzicht kunnen geven in de aard van de chemische en biologische veranderingen die zullen optreden op het traject van rantsoenaanpassing. Bij aanvang van het VEL & VANLA Mineralenproject (1998/1999) bestond het gemiddelde rantsoen uit 170 g RE kg^{-1} voer en 943 VEM [Verhoeven e.a., 2003]. Als streefwaarden worden binnen het Mineralenproject de volgende waarden gehanteerd: 150 g RE kg^{-1} voer en 900 VEM [Verhoeven e.a., 2003]. Elk van de vier rantsoentypes werd op twee verschillende manieren gerealiseerd. De twee varianten van de energierijke rantsoentypes bleken vooral te verschillen in het aandeel slecht verterende celwanden (NDF, tabel 3), een verschil dat met name werd beïnvloed door toevoeging van snijmaïs aan het rantsoen jonge graskuil.

Chemische samenstelling van de vaste mest

Alhoewel de droge stofgehaltes van de mesten niet significant van elkaar verschilden, zijn bepaalde trends wel zichtbaar. In de rantsoenen met de oude graskuil was het drogestof gehalte van de mest het hoogst (HGO: 17.8%; LGO: 18.5%) (figuur 5).

Tabel 3. Rantsoenen in de rantsoenproef en een selectie van voederkwaliteitsindicatoren.

CODE	RUWVOER	VOEDERKWALITEITSINDICATOREN				
		ruw eiwit (g/kg ds)	VEM	C/Ntot	NDF (g/kg ds)	Verterings-coëfficiënt (%)
HGJ	Graskuil jong	hoog	hoog	13.9	403	80.7
HSG	40% graskuil jong/60% snijmaïs	hoog	hoog	15.3	374	79.1
HGO	Graskuil oud	hoog	laag	14.9	489	70.8
HST	Stro	hoog	laag	15.1	498	67.3
LSG	40% graskuil jong/60% snijmaïs	laag	hoog	24.3	396	78.6
LSN	Snijmaïs	laag	hoog	27.9	371	76.9
LGO	Graskuil oud	laag	laag	24.3	549	69.8
LST	Stro	laag	laag	26.4	555	66.8

Ruw eiwit (RE) hoog = 200 g RE/kg ds, laag =110 g RE/kg ds; VEM, Voedings Eenheid Melk, 1VEM = 6.9 KJ, VEM hoog = 975, VEM laag = 750; NDF is maat voor de hoeveelheid celwanden in het rantsoen; Verteringscoëfficiënt (%) organische stof werd bepaald met behulp van penssap.

Deze mesten waren relatief vast of droog, terwijl de overige mesten slapper waren. De C:N ratio en de $C:N_{organisch}$ ratio van de verschillende mesten verschilden wel significant van elkaar. Mesten van dieren op een eitwitarm rantsoen met stro, snijmaïs of oude graskuil, of een eiwitrijk rantsoen met stro, hadden de hoogste $C:N_{organisch}$ ratio (figuur 6). Het eiwitrijke rantsoen met de jonge graskuil had de laagste $C:N_{organisch}$ ratio.

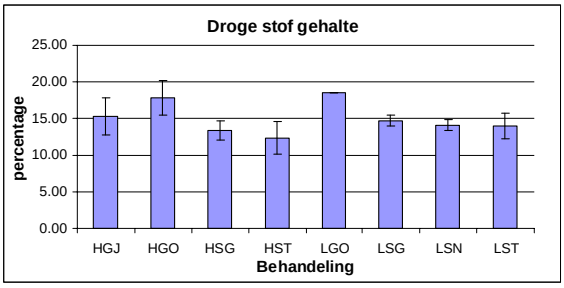


Fig. 5. Droge stof gehaltes in mesten van koeien met 8 verschillende rantsoenen.

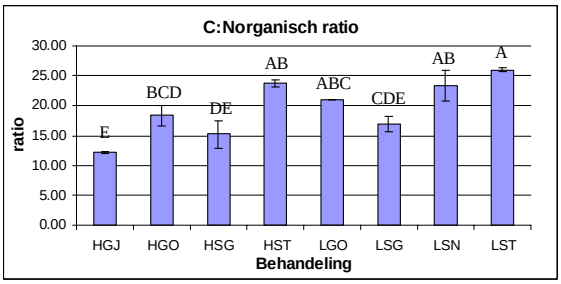


Fig. 6. C:Norganisch ratio van de mesten van koeien met 8 verschillende rantsoenen.

Naarmate de fractie minerale stikstof in de mest hoger is bestaat er een grotere kans op stikstofverliezen door vervluchtiging, denitrificatie en uitspoeling. Deze minerale stikstof in de mest is via decompositie door micro-organismen vrijgemaakt (=gemineraliseerd) uit de organisch gebonden N-fractie in het voer. Het omslagpunt voor stikstofmineralisatie en -immobilisatie ligt bij een C:N ratio van ongeveer 15. Bij een lagere C:N ratio vindt stikstofmineralisatie plaats, terwijl er bij een hogere ratio stikstofimmobilisatie plaatsvindt. Immobilisatie betekent dat de micro-organismen alle stikstof die ze uit hun voedsel halen benutten voor groei en dus vastleggen in microbiële biomassa. De stikstofanalyses van de mest uit dit experiment tonen dit inderdaad aan. De mest van de behandelingen HGJ, HSG en LSG heeft een lage $C:N_{organisch}$ ratio, waardoor stikstofmineralisatie eenvoudig kan plaatsvinden. De hoeveelheid gemeten $N_{mineraal}$ in HGJ en HSG was inderdaad hoger dan in de andere behandelingen (figuur 7). In de behandelingen met een hoge $C:N_{organisch}$ ratio ($C/N_{organisch}$ ratio >20) werd een lagere hoeveelheid $N_{mineraal}$ aangetroffen (figuur 7). In alle gebruikte mestsoorten was ongeveer 5 tot 8 % van de totale hoeveelheid stikstof aanwezig als minerale stikstof.

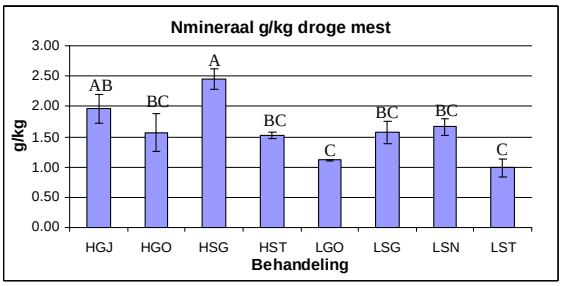


Fig. 7. De hoeveelheid Nmineraal in mesten van koeien met 8 verschillende rantsoenen.

Bacteriegemeenschap in de vaste mest

Bacteriële diversiteit

In alle mesten was de bacteriële diversiteit hoog. Het aantal banden varieerde van 35 (HST koe 8025) tot 43 (LSG koe 6100) (figuur 8), hetgeen vergelijkbaar is met het aantal DNA-banden in

de mest van het EM-overlevingsexperiment (mest afkomstig uit het VEL & VANLA gebied; gemiddeld 36 DNA-banden; zie elders in dit rapport).

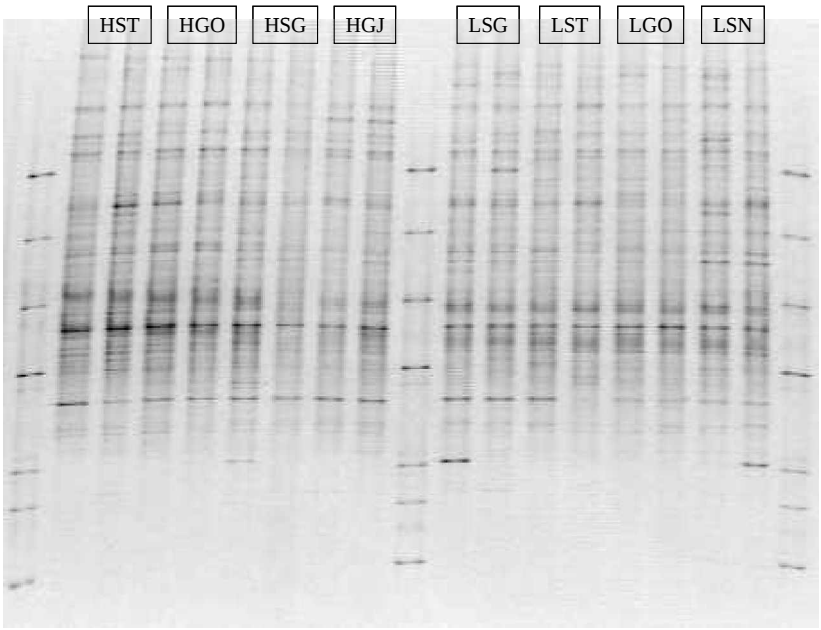


Fig. 8. DGGE-gel van het bacteriële DNA, aanwezig in mest uit koeien met verschillende rantsoenen.

De 16 mesten vertoonden zeer grote overeenkomsten in soortensamenstelling. Gebaseerd op de aan- of afwezigheid van DNA-bandjes was de laagste similariteit 64% (Jaccard coëfficiënt: behandeling LSG koe 6100 en HGO koe 6236) en de hoogste 92% (LGO koe 82296 en LSN 8229) (figuur 9). Een Jaccard coëfficiënt van 1 betekent dat de monsters volledig overeenkomen, bij een coëfficiënt van 0 is er geen enkele overlap in DNA-samenstelling tussen de monsters. Opgemerkt moet worden dat in de originele beelden meer DNA-banden zijn te zien dan in de afgedrukte figuren van iets lagere kwaliteit.

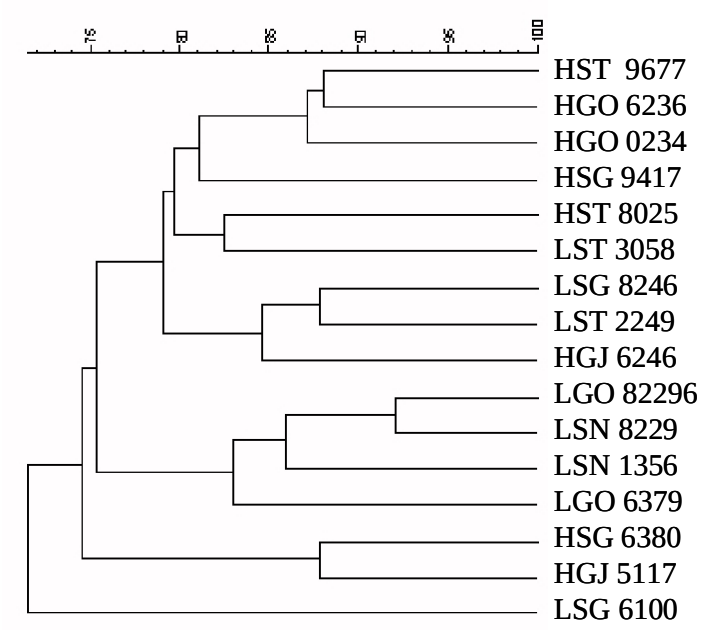


Fig. 9. Clusterdiagram van de similariteit (Jaccard coëfficiënt; %) in bacterie DNA-banden van de 16 mesten. De Jaccard coëfficiënt maakt alleen gebruik van bacteriesoortensamenstelling, niet van biomassa.

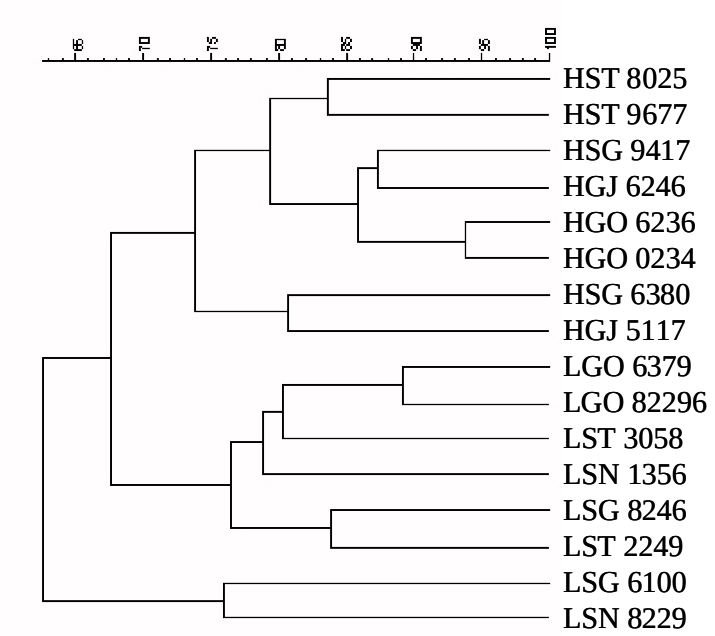


Fig. 10. Clusterdiagram van de similariteit (Pearson coëfficiënt; %) in bacterie DNA-banden van 16 mesten. De Pearson coëfficiënt maakt gebruik van bacteriesoortensamenstelling en biomassa.

De clusteranalyse laat tevens zien dat er geen eenduidige effecten van de verschillen in rantsoensamenstelling waren op de soortensamenstelling van de geproduceerde mest. Bij deze analyse werd alleen rekening gehouden met de aan- of afwezigheid van DNA-banden. Wordt er tevens rekening gehouden met de relatieve abundantie van de diverse bacteriesoorten dan ontstaat een ander beeld (figuur 10). In figuur 10 is een clusterdiagram weergegeven dat is berekend met de Pearson coëfficiënt, een index die naast de aan- en afwezigheid van een DNA-band tevens gebruik maakt van informatie over de dikte van de band. De dikte van de band is een maat voor de hoeveelheid aanwezig DNA en dus voor de aantallen van de betreffende bacteriesoort(en) (hoe meer individuen van een bacteriesoort, hoe meer DNA, hoe dikker de band).
Bij het toepassen van deze extra informatie (hoeveelheid DNA) vallen de bacteriële gemeenschappen duidelijk uiteen in 2 groepen. De behandelingen met een hoog gehalte aan ruw eiwit (de H-behandelingen) onderscheiden zich van de behandelingen met een laag gehalte aan ruw eiwit (de L-behandelingen).

Bacteriële biomassa en activiteit
In figuur 11 en 12 is respectievelijk het aantal bacteriecellen en de bacteriebiomassa in de 16 mestsoorten weergegeven. Beide figuren komen sterk overeen, omdat de biomassa wordt berekend uit het aantal bacteriën vermenigvuldigd met het celvolume.

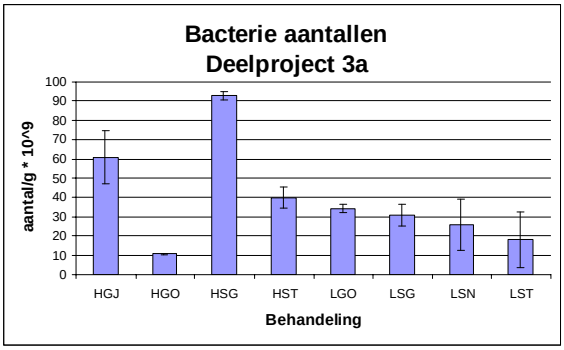


Fig. 11. Aantal bacteriën per gram droge stof in de verschillende mestsoorten.

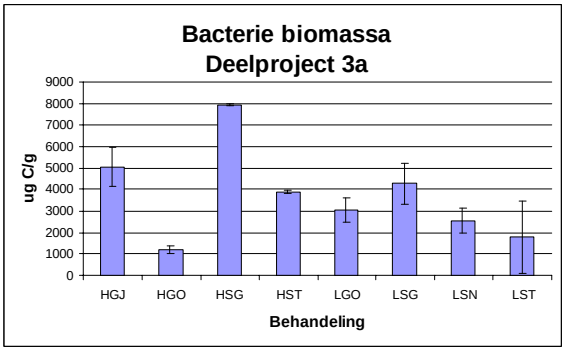
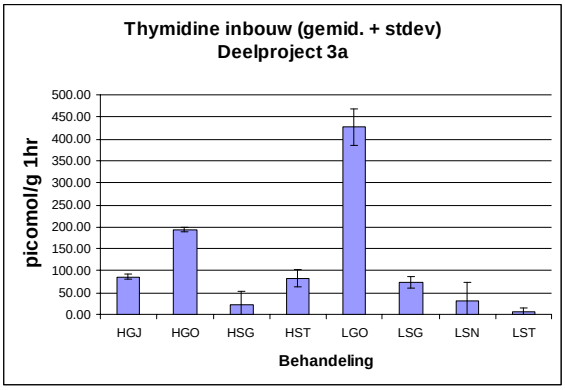


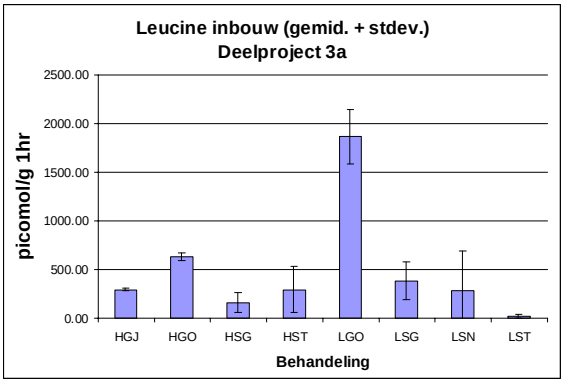
Fig. 12. Bacteriële biomassa uitgedrukt in µg C per gram droge stof in de verschillende mestsoorten.

Het rantsoen dat het meest lijkt op de gangbare praktijk is het eiwitrijke rantsoen van de jonge graskuil (HGJ). De mest die op dit rantsoen werd geproduceerd bevatte een hoge bacteriebiomassa (5000 µg C g^{-1}). De activiteit van de bacteriegemeenschap in deze mest, gemeten als de inbouwsnelheid van thymidine en leucine, was relatief laag (figuur 13 en 14). Dit rantsoen is rijk aan stikstof en makkelijk afbreekbare koolstofbronnen (lage C/N ratio, lage NDF; tabel 3), zodat na darmpassage een door koolstofbeperking tamelijk inactieve microbiële populatie resteert. Dit werd in versterkte mate gevonden voor hetzelfde rantsoen, maar dan aangevuld met snijmaïs (HSG; rantsoen met een nog kleiner aandeel moeilijk verteerbare celwanden (NDF) in het rantsoen). De beoogde veranderingen in rantsoensamenstelling binnen het VEL & VANLA Mineralenproject gaan in de richting van een eiwitarm rantsoen van oude graskuil (LGO). De mest van dit rantsoen had een ten opzichte van HGJ verlaagde bacteriebiomassa (3000 µg C g^{-1}) met een zeer hoge groeisnelheid. Ook in de mest op een eiwitrijk rantsoen van dezelfde oude graskuil (HGO) werd een relatief actieve bacteriepopulatie gevonden (hoge bacterieactiviteit/-biomassa ratio). Deze bacteriepopulaties werden nu niet beperkt door koolstof en konden zich juist voorzien in hun stikstofbehoefte (C/N ratio 15-20). Een hoge groeisnelheid die gepaard gaat met een relatief lage bacteriële biomassa wijst op een hoog verlies aan bacteriën. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door protozoën die bacteriën eten. Begrazing is vaak selectief op grotere cellen, waardoor kleinere cellen de overhand krijgen; dit zou dan te zien moeten zijn in een lager gemiddeld bacteriecelvolume. Gemiddeld celvolume in de HSG en HGJ behandelingen was resp. 0.27 en 0.26 μm^3. Dit komt overeen met het celvolume in de LGO en LST behandelingen. Het grootste celvolume (0.42 μm^3) werd aangetroffen in de LSG behandeling. Omdat het celvolume in de HSG en HGJ (hoge aantallen, lage activiteit) overeenkomt met het celvolume in de LGO behandeling (gemiddelde aantallen, hoge activiteit), geeft het celvolume geen nadere aanwijzing voor mogelijke predatie. Door de predatie van protozoën op bacteriën zal een deel van de in de bacteriën vastgelegde (=geïmmobiliseerde) stikstof worden gemineraliseerd. Dat het gehalte aan N_{min} in de LGO mest desondanks zeer laag was (figuur 7) komt door het relatieve gebrek aan stikstof (hoge C/N ratio) in de mest, waardoor de via predatie gemineraliseerde N direct weer werd geimmobiliseerd door de snelgroeiende micro-organismen. De hoogste gehalten aan N_{min} werden gevonden in de HGJ en HSG mesten met lage C/N ratio's en relatief inactieve bacteriepopulaties. Als de bacteriële groeisnelheid sterk beperkt is, bijvoorbeeld door gebrek aan koolstof, en het voedsel van de bacteriën relatief veel N bevat (hoog eiwit, lage C/N verhouding), dan zal een groot deel van het voedsel niet worden benut voor groei van biomassa, maar worden gemineraliseerd. Dit kan de oorzaak zijn van hogere N_{min} gehalten in de mest. Een verdere verlaging van de energie-inhoud van het eiwitarme LGO rantsoen door het voeren van stro (LST) leidde tot een mest met een hogere C/N ratio, waarin zich slechts een zeer kleine vrijwel inactieve bacteriegemeenschap wist te handhaven.



Figuur 13.

Fig. 13. Groeisnelheid van bacteriën in de mest gemeten via thymidine inbouw (maat voor vorming van DNA).



Figuur 14.

Fig. 14. Groeisnelheid van bacteriën in de mest gemeten via thymidine inbouw (maat voor eiwitsynthese).

Conclusie

Aanpassingen in het rantsoen van de koeien hadden geen effect op de soortensamenstelling van de bacteriële darmflora. De aanpassingen hadden daarentegen wel gevolgen voor de onderlinge aantallen cellen en de biomassaverhoudingen binnen de bacteriegemeenschap.

Veranderingen in het rantsoen leiden dus tot veranderingen in de samenstelling van de darmflora. En deze veranderingen worden vooral gestuurd door het eiwitgehalte van het voer. Het is mogelijk dat een verlaging van het eiwitgehalte via een verlaagde N-beschikbaarheid heeft geleid tot een relatieve verschuiving binnen de bacteriële gemeenschap in het voordeel van bacteriën met een relatief hoge N-efficiëntie. Omdat we de banden op de DGGE niet nader hebben onderzocht kunnen we echter geen conclusies over deze verschuiving trekken.

In paragraaf 3.3 wordt onderzocht hoe groot de ammoniakemissie was in de op de 8 rantsoenen geproduceerde drijfmesten.

3.3 Invloed van rantsoensamenstelling op de ammoniakvervluchtiging in drijfmest

Inleiding

De hoeveelheid stikstof die uit drijfmest kan vervluchtigen in de vorm van ammoniak wordt voor een belangrijk deel bepaald door de samenstelling van de drijfmest. Onderzocht is of een vezelrijker en eiwitarmer rantsoen resulteert in een mest met een lagere ammoniak vervluchtiging. Hiertoe werden metingen verricht aan de vrije nutriëntenconcentraties in de 8 verschillende drijfmesten uit de rantsoenenproef (zie paragraaf 3.2) en werd een ammoniakvervluchtigingsexperiment uitgevoerd met de drijfmesten.

Resultaten

NH_4^+ en Mg^{2+} concentraties

In dit onderdeel wordt beschreven wat de invloed is van de samenstelling van het rantsoen van de koe op de door de koe geproduceerde mest. Naar verwachting heeft het rantsoen een belangrijk effect op de kwaliteit van de mest. In tabel 4 worden enige kenmerken van de gevoerde rantsoenen vermeld.

Tabel 4. Overzicht van enkele karakteristieken van de onderzochte drijfmesten en de totale (mM) en vrije (mM, %) nutriëntconcentraties van ammonium en magnesium in drijfmesten die werden geproduceerd op verschillende rantsoenen. Tussen haakjes ( ) staat de standaardafwijking weergegeven. Voor een omschrijving van de codes zie tabel 3.

					Ammonium		Magnesium		
Code	DM [% m/m]	Ev [mS/cm]	I [mol/l]	pH [-]	N_{totaal}* [mM]	NH_4^+ [mM]	Mg_{totaal} [mM]	Mg^{2+} [mM]	[% vrij]
HGJ	10	28	0.4	8.0	442	235	40	0.14	0.4
	(0.1)	(0.4)	(0.01)	(0.03)	(46.6)	(22.6)	(3.0)	(0.06)	
HSG	10	28	0.4	7.6	415	270	30	0.96	3.2
	(0.2)	(0.6)	(0.01)	(0.15)	(55.0)	(16.4)	(3.6)	(0.25)	
HGO	14	22	0.3	8.2	436	249	40	2.92	7.4
	(0.8)	(0.5)	(0.01)	(0.04)	(72.5)	(3.3)	(3.1)	(1.09)	
HST	10	216	0.3	8.4	352	206	24	1.38	5.8
	(0.2)	(0.4)	(0.01)	(0.05)	(94.0)	(27.7)	(2.7)	(0.37)	
LSG	11	20.0	0.3	7.2	358	174	33	8.58	27.0
	(0.2)	(0.4)	(0.01)	(0.02)	(61.2)	(6.6)	(1.7)	(3.13)	
LSN	11	16	0.2	7.2	383	173	30	2.97	9.8
	(0.3)	(0.3)	(0.01)	(0.07)	(60.9)	(16.3)	(2.5)	(0.24)	
LGO	14	14	0.2	7.4	337	124	34	8.29	24.4
	(0.1)	(0.8)	(0.01)	(0.12)	(34.9)	(18.9)	(1.8)	(1.73)	
LST	11	13	0.2	7.6	326	132	32	7.72	24.4
	(0.3)	(0.6)	(0.01)	(0.09)	(22.7)	(12.2)	(3.4)	(4.57)	

DM = droge stofgehalte; Ev = elektrische geleiding; I = zoutsterkte; pH = zuurgraad
* Totaal stikstofgehalte in mest; vrije concentraties werden gemeten met de DMT-manure cel

Uit tabel 4 blijkt dat de zoutsterkte (I) en de zuurgraad (pH) van de drijfmest beïnvloed werden door het ruw-eiwitgehalte (RE) van de rantsoenen. Hogere ruw-eiwitgehaltes in de rantsoenen (HGJ, HGO, HST en HSG) zorgden voor een toename van de zoutsterkte van de mest en ook voor een stijging van de pH. Verder blijkt uit tabel 4 dat rantsoenen die wat betreft de energie- en eiwitniveaus vergelijkbaar waren, maar die waren samengesteld uit verschillende combinaties van de ruwvoercomponenten, ook wat betreft de chemische mestsamenstelling grote overeenkomsten vertoonden (rantsoenen HGJ en HSG, HGO en HST, LSG en LSN, en LGO en LST).
In tabel 4 zijn ook de vrije en totale ionconcentraties weergegeven van de nutriënten ammonium en magnesium in de drijfmesten die werden geproduceerd op de verschillende rantsoenen. Uit de resultaten blijkt dat het voeren van koeien met rantsoenen met een hoger ruw eiwitgehalte (HGJ, HGO, HSG en HST) leidt tot een grotere fractie vrij ammonium in drijfmest. Dit zal naar verwachting van invloed zijn op de stikstofvervluchtiging uit mest. Voor het nutriënt magnesium geldt een omgekeerde relatie. Zowel de totale concentratie vrij magnesium, als het percentage vrij magnesium in de mest zijn hoger in drijfmest van rantsoenen met een laag eiwitgehalte, dan in drijfmest van rantsoenen met een hoog eiwitgehalte. Aangezien de LSG, LGO en LST mesten verder afgebroken moeten worden om voldoende energie en nutriënten beschikbaar te krijgen, komt uit deze mesten waarschijnlijk ook meer magnesium vrij.

Ammoniakvervluchtiging
In figuur 15 is de cumulatieve stikstofvervluchtiging voor de acht mesten bij 12 ^{o}C weergegeven. Er bestaan grote verschillen ten aanzien van de stikstofemissie uit de drijfmesten. De drijfmesten op rantsoenen met een hoog eiwitgehalte (HGJ, HSG, HST en HGO) hadden een veel hogere

stikstofvervluchtiging dan de mesten op rantsoenen met een laag eiwitgehalte (LSG, LSN, LST en LGO) (significant, p<0.05).

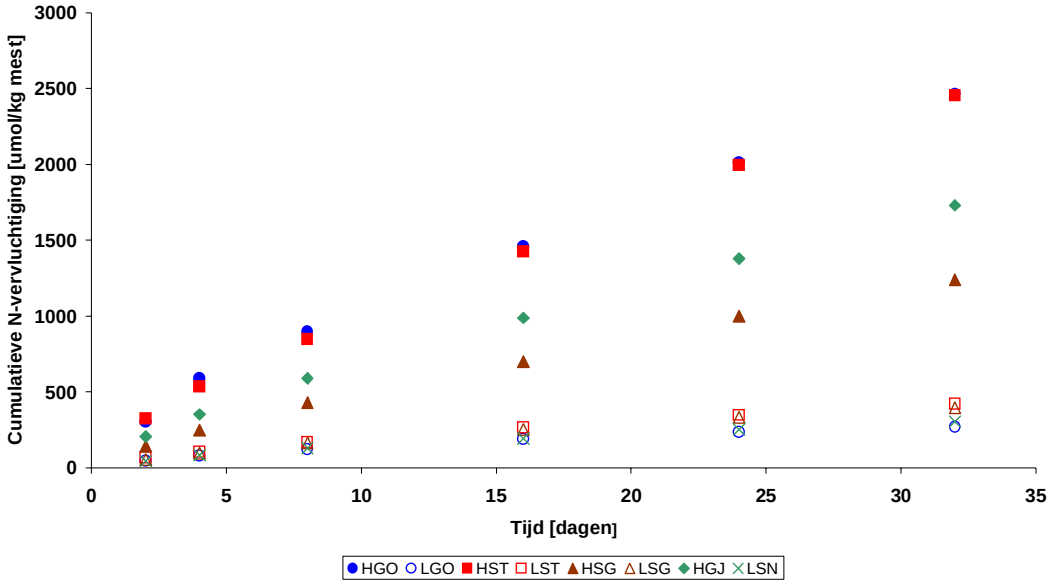


Fig. 15. Cumulatieve stikstofvervluchtiging als functie van de tijd bij 12 oC. (zie tabel 3 voor een verklaring van de afkortingen).

Rangschikking van de rantsoenen naar de hoeveelheid stikstof vervluchtigd na 32 dagen geeft de volgende reeks (HGO ≈ HST)> HGJ > HSG > (LST ≈ LSG) >LSN > LGO (data log10 getransformeerd F= 13.02; p < 0.0001). Opvallend is dat 3 van de 4 mesten op rantsoenen met een lage energie-inhoud (vezelrijker; HGO, HST en LST) een hogere stikstofvervluchtiging hadden dan de mesten op rantsoenen met een hogere energie-inhoud. Dit effect was het sterkst voor de mesten op de rantsoenen met een hoog eiwitgehalte (HGO en HST).

Conclusie

De rantsoensamenstelling heeft een sterk effect op de kwaliteit van de geproduceerde drijfmest en met name op de fractie vrije nutriënten. Of er sprake is van toename dan wel een afname van de vrije nutriëntfractie hangt af van de samenstelling van het rantsoen en het soort nutriënt. De mesten met de laagste concentratie vrij ammonium (geproduceerd op de eiwitarme rantsoenen) hadden ook de laagste ammoniakemissie.

3.4 Overleving van toegevoegde micro-organismen in mest

Inleiding

Er bestaat veel onduidelijkheid over het praktische nut van mestadditieven. Hun positieve werking ten aanzien van de vermindering van ammoniakvorming en complexering van gifstoffen (zoals indol, fenol e.d.) is omstreden. Desondanks worden de middelen op grote schaal binnen de agrarische sector toegepast. Een van de gebruikte mestadditieven is EM (Effectieve Microorganismen). In Nederland wordt een EM-product gebruikt dat bekend staat onder de naam EM1. Teruo Higa is de geestelijk vader van EM. In Higa [1998] stelt hij dat door toevoeging van EM aan mest in de mestkelder de drijfmest homogener zou blijven en er minder korstvorming zou optreden. Ook zou het de stank in de stal en tijdens het uitrijden verminderen. Gebruikers van EM brengen deze veranderingen in de mest aan in verband met mogelijk gunstige effecten op de

ammoniakemissie uit drijfmest. Bovendien claimen boeren die EM aan de drijfmest toevoegden dat het gras na het uitrijden van met EM behandelde mest niet verbrandde [Peters, 1999].
Volgens Higa [1998] en "grijze" literatuur op het internet bevat EM ongeveer 80 soorten micro-organismen die behoren tot de volgende groepen: 1) fotosynthetiserende bacteriën; 2) melkzuurbacteriën; 3) gisten; 4) actinomyceten; en 5) schimmels die fermentatie veroorzaken (bijv. *Aspergillus* en *Penicillium*). Voordat EM1 gebruikt kan worden, moet ze worden 'geactiveerd', d.w.z. dat er een micro-organismenmengsel moet worden opgekweekt vanuit een stockoplossing (de EM1-stockoplossing). De zo verkregen geactiveerde EM-oplossing wordt EM-Aktief (EM-A) genoemd.
In het hier beschreven onderzoek wordt nagegaan in hoeverre de bacteriën uit een EM-Aktief-oplossing nog zijn terug te vinden nadat ze zijn toegevoegd aan mest, en of er uiteindelijk effecten zijn op de gewasopbrengst (paragraaf 3.5).

Hypothesen: Onderzoek naar de effecten van toepassing van EM zijn tot op heden niet wetenschappelijk onderbouwd. In de microbiële ecologie gaat men uit van de stelling: alles is overal en het milieu selecteert. Een algemeen probleem met toevoeging van micro-organismen aan een milieu (bijvoorbeeld de bodem) is dat de gekweekte organismen de concurrentie met de van nature voorkomende populaties verliezen. De natuurlijke organismen zijn in veel grotere aantallen aanwezig en optimaal aangepast. Daardoor lopen de aantallen en activiteit van de toegevoegde organismen snel terug. Bovendien zijn gekweekte micro-organismen meestal aanzienlijk groter en dikker en worden daardoor bij voorkeur opgegeten door predatoren zoals protozoën. Concurrentie tussen soorten is ook de reden dat het vrijwel onmogelijk is om de samenstelling van een complex mengsel onder controle te houden. Men kan wel 80 soorten toevoegen, maar dit resulteert altijd in een beperkt aantal overheersende soorten. De rest verdunt uit of verdwijnt. EM worden gekweekt met veel suiker onder zuurstofarme omstandigheden. Dit resulteert in een zuur mengsel met een pH van 3 tot 4. De omstandigheden in de mest zijn heel anders met een pH rond de 7. Om die redenen toetsten wij de volgende hypothesen:

1. In het probioticum Effectieve Micro-organismen zijn veel minder dan de geclaimde 80 soorten terug te vinden met een algemeen gangbare DNA-analyse methode (PCR-DGGE), terwijl de soortensamenstelling niet constant en niet reproduceerbaar zal zijn.
2. Bij toevoeging van het probioticum aan mest zullen de toegevoegde micro-organismen niet of nauwelijks terug te vinden zijn en geen significant effect hebben op de samenstelling van de microbiële gemeenschap in de mest.
3. Door de geringe overleving zal toevoeging van Effectieve Micro-organismen aan mest geen effect hebben op de hoeveelheid en aard van de stikstof in de mest, en op de gewasgroei.

Het experiment is opgedeeld in een aantal onderzoeksvragen.

Vraag 1: Bestaat er variatie tussen EM-stockoplossingen?

Vraag 2: Is de samenstelling van de EM-Aktiefoplossing reproduceerbaar, of hangt het af van de maker en het toeval?

Vraag 3: Zijn bacteriën uit de EM-Aktiefoplossing 6 weken na toevoeging terug te vinden in de mest?

Vraag 4: Heeft toevoeging van EM-Aktief aan mest gevolgen voor de chemische samenstelling van de mest na 6 weken incubatie?

Vraag 5: Heeft toevoeging van EM-Aktief aan drijfmest gevolgen voor de stikstofwerking van deze mest?

De resultaten van onderzoeksvraag 5 worden gepresenteerd in hoofdstuk 3.5. In hoofdstuk 3.6 wordt de ammoniakemissie in de verschillende mest-additief-combinaties onderzocht.

Resultaten en discussie

DNA-analyses EM-stocks

In figuur 16 en 17 zijn de resultaten van de DNA-bepalingen weergegeven (**onderzoeksvraag 1 en 2**). Uit figuur 16 valt op te maken dat de bacteriële diversiteit in de twee EM-stockoplossingen, d.w.z. de oplossingen die onafhankelijk van elkaar rechtstreeks van de leverancier werden verkregen, van elkaar verschilden. In EM-Stock 1 (door Agriton ter beschikking gesteld aan WU Bodemkwaliteit) zijn 12 DNA-banden te onderscheiden, in EM-Stock 2 (verkregen via de vertegenwoordiger in Friesland) zijn 15 banden te onderscheiden. Hierbij moet worden opgemerkt dat in de originele beelden op het computerscherm de DNA-banden veel beter zichtbaar zijn dan na het afdrukken op gewoon papier. De meeste dominante DNA-banden van stock 1 zitten op een andere plaats in de gel dan die van stock 2. Dit betekent dat in stock 1 andere soorten domineren dan in stock 2. De relatie tussen DNA-banden en bacteriesoorten is niet simpelweg 1 op 1. Sommige soorten geven meer dan 1 band op de gel, terwijl andere niet zichtbaar worden. Verder kunnen verschillende soorten toevallig op dezelfde positie in de gel terechtkomen, waardoor maar 1 band zichtbaar wordt. Er kan dus zowel over- als onderschatting optreden. In het algemeen weerspiegelt het aantal DNA-banden het aantal soorten bacteriën, terwijl de intensiteit van de banden is gecorreleerd met de relatieve hoeveelheden [Dilly e.a., in druk]. Voor het gemak spreken we over bacteriesoorten. In werkelijkheid is de genetische variatie binnen bacteriën zo groot dat men vaak spreekt over genotypen of “operational taxonomic units” (OTUs). Eén basenpaar verschil in het DNA geeft al een andere positie op de DGGE-gel. De afstand tussen twee soorten op de gel zegt niets over de mate van verwantschap.

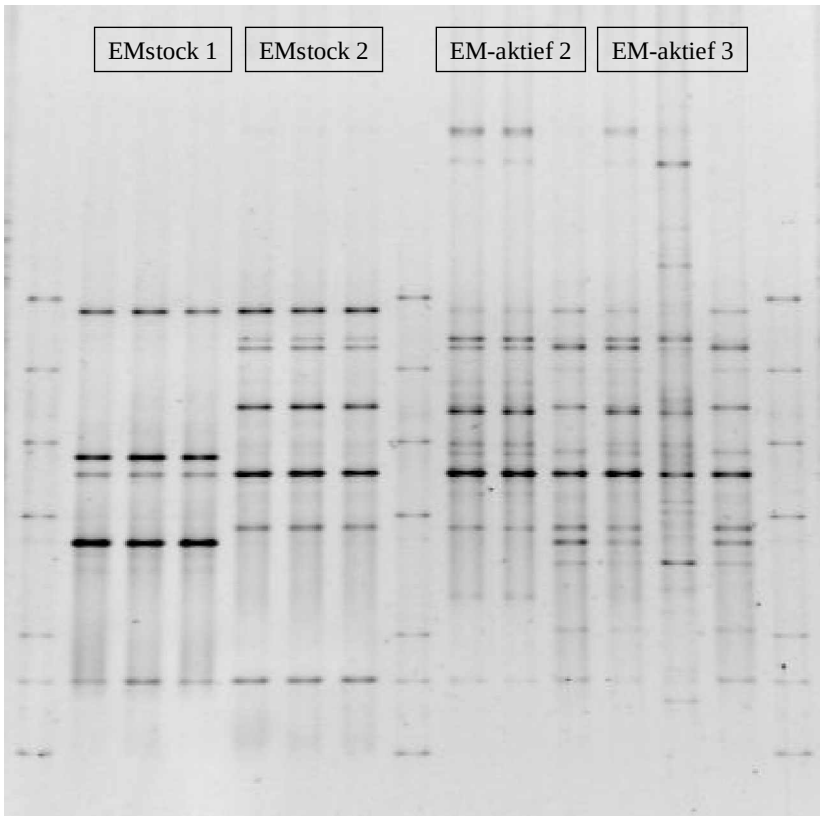


Fig. 16. DGGE-gel van het bacteriële DNA aanwezig in twee verschillende EM-stocks, in een EM-Aktiefoplossing (EM-Aktief2) die werd aangemaakt met behulp van EM-Stock 2 en in een EM-Aktiefoplossing (EM-Aktief3), waarvan de EM-Stock niet werd geanalyseerd.

PCR-DGGE is een semi-kwantitatieve methode om de bacteriële soortensamenstelling te meten. In een gram grond komen ongeveer een miljard (10^9) bacteriën voor, die met deze methode meestal 50 tot 80 DNA-banden te zien geven. Er zitten weliswaar duizenden soorten in een gram grond, maar de meeste komen in geringe aantallen voor. Als van een soort minder dan een miljoen (10^6) cellen per gram voorkomen is geen DNA-band meer te zien op de gel. Het ontbreken van een DNA-band betekent dus niet dat de soort er absoluut niet in zit, maar dat de soort minder dan 1 promille vormt van het totale aantal bacteriën. Er zijn specifieke methoden om zeldzamere soorten te identificeren en te kwantificeren, maar deze kosten een veel grotere inspanning, zeker voor tientallen soorten. Bovendien is er geen reden om te zoeken naar bepaalde en/of zeldzame soorten zolang het niet duidelijk is wat hun functie is. Daarom volstaan we met de algemene "fingerprint" methode. De DNA-profielen wijzen er op dat de EM-mengsels bestaan uit een beperkt aantal (enkele tientallen) soorten.

Nadat de EM-Stock een week was geïncubeerd met melasse en water (EM-Aktief), werden er soms meer banden aangetroffen dan er in de uitgangsstock aanwezig waren. Blijkbaar zijn de concentraties van bepaalde bacteriesoorten in de EM-Stock zo laag dat deze onder de detectielimiet van 1 promille vallen. Anderzijds werd in een eerste door de vertegenwoordiger in Friesland aangeleverde EM-Aktiefoplossing in het geheel géén bacterieel DNA aangetroffen! Deze EM-Aktief was geïncubeerd bij een lagere temperatuur (ca. 12^oC) dan vermeld in het voorschrift van Agriton (22^oC). In de EM-Aktief 2 oplossing (gemaakt vanuit stockoplossing 2) werden 17, 16 en 18 banden aangetroffen. In de EM-Aktief 3 oplossing werden 25, 35 en 17 banden aangetroffen. Deze laatste oplossing werd gemaakt van een EM-Stock die niet op DNA was geanalyseerd. In geen van de EM-Aktiefoplossingen werden ook maar bij benadering 80 verschillende DNA-banden aangetroffen. De DNA-bandensamenstelling van de twee EM-Aktiefoplossingen verschillen sterk van elkaar (Jaccard coëfficiënt = 0.6) Een Jaccard coëfficiënt van 1 betekent dat de monsters volledig overeenkomen, bij een coëfficiënt van 0 is er geen enkele overlap in DNA-samenstelling tussen de monsters. Bovendien waren er ook behoorlijke verschillen tussen de drie herhalingen van dezelfde EM-Aktiefoplossing. Dit duidt op een slechte reproduceerbaarheid van de samenstelling van complexe cultures.

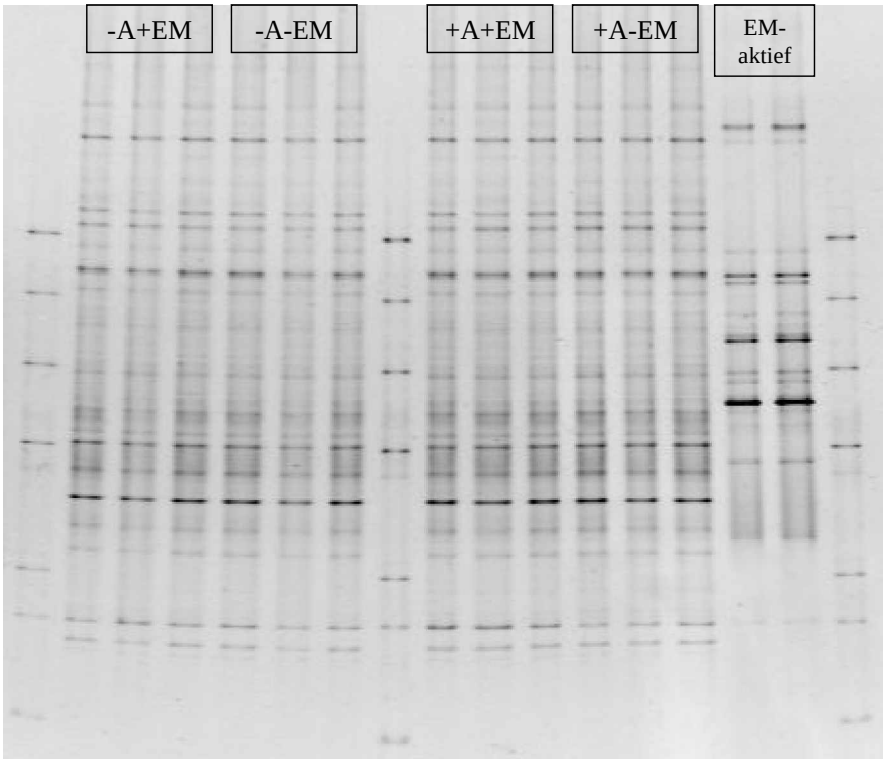


Fig. 17. DGGE-gel van het bacteriële DNA aanwezig in mest met en zonder EM en/of Agri-mest (A) en in de EM-Aktiefoplossing die werd gebruikt voor beënten van de mesten.

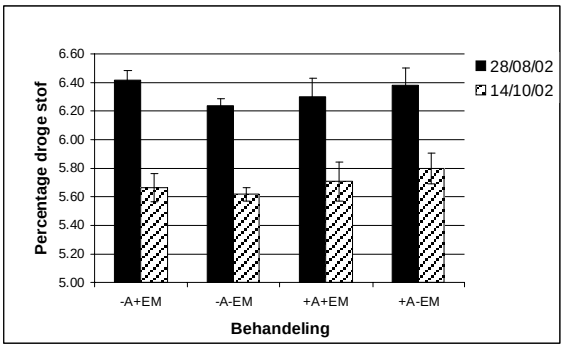
Overleving van EM-bacteriën in mest

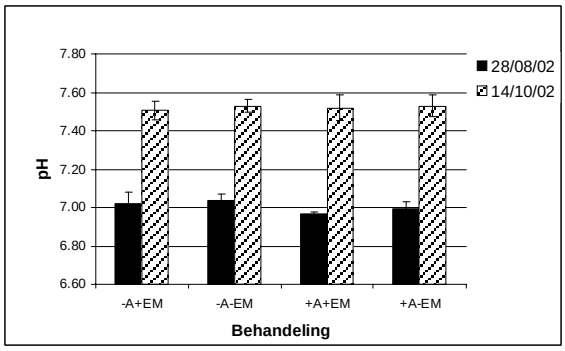
De resultaten van **onderzoeksvraag 3** (zijn bacteriën uit de EM-Aktiefoplossing 6 weken na toevoeging terug te vinden in de mest?), staan weergegeven in figuur 17. In de EM-Aktiefoplossing die werd gebruikt voor de incubatie van de mesten werden 15 DNA-banden aangetroffen (laatste twee lanen in figuur 17). In de mesten werden gemiddeld 36 banden aangetroffen. De similariteit tussen de DNA-bandenpatronen van de verschillende mestbehandelingen is hoog; de laagste Jaccard coëfficiënt was 0.77. Er waren geen aantoonbare verschillen tussen de behandelingen met en zonder EM en met en zonder Agri-mest. Opvallend is wel dat een aantal dominante banden in de EM-Aktieflanen niet is terug te vinden in de mestbehandelingen, hetgeen erop duidt dat deze soorten zich slecht kunnen handhaven in de mest. Enkele banden in de EM-Aktiefoplossingen corresponderen met banden in de mest. Omdat deze banden ook voorkomen in mest zonder EM-toevoeging is het niet waarschijnlijk dat deze bacteriesoorten afkomstig zijn uit de EM-toevoeging. Het interspecifieke concurrentievermogen van EM ten aanzien van andere micro-organismen lijkt niet groot. Van Egeraat [1998] vond namelijk dat op een agar-medium de micro-organismen in EM1 geen aantoonbaar negatief effect hadden op de groei van een selectie van micro-organismentaxa. Toevoeging van EM heeft dus geen significant effect op de samenstelling van de bacteriële gemeenschap in de mest. EM-leveranciers gaan er van uit dat de toegevoegde “nuttige” micro-organismen dominant moeten worden voor een effectieve werking. [Higa, 1998].

Effecten van EM en Agri-mest op de chemische samenstelling van de mest

In de figuren 18 tot en met 23 zijn de resultaten van de chemische analyses weergegeven. De in deze proef gebruikte mest had een laag droge stofgehalte (6.3%). De mest werd verzameld in de zomer. De koeien staan dan overdag buiten, waardoor er in de stal minder mest wordt verzameld. Afvalwater van het melken komt wel bij de mest, waardoor deze sterker wordt verdund dan in een periode waarin de koeien continu op stal staan.

Na 6 weken incubatie was het droge stofgehalte van de mest, onafhankelijk van de behandeling, significant nog lager (6.3% vs 5.7%, figuur 18). De pH in de mest was na 6 weken significant toegenomen (7.5 vs 7.0, figuur 19). De afname van het droge stofgehalte duidt op afbraak van organisch materiaal, hetgeen in overeenstemming is met de toename van de pH die duidt op de vorming van carbonaten in de mest. De afbraak van organisch materiaal werd niet beïnvloed door toevoeging van EM en/of Agri-mest.





(A = Agri-mest mineraal en Agri-mest vloeibaar; EM = Effectieve Micro-organismen: + aanwezig; - = niet aanwezig)

Fig. 18. Percentage droge stof van vier mestsoorten bij aanvang en na 6 weken incubatie.

Fig. 19. pH in de mest uit figuur 18.

Het percentage koolstof in de droge mest was na 6 weken onveranderd en schommelde rond de 36%, terwijl het totale percentage aan stikstof iets was afgenomen (statistisch significant tijdeffect $p<0.017$). Gedurende de 6 weken incubatie veranderde de hoeveelheid organische stikstof

niet aantoonbaar in de verschillende behandelingen. Ook de $C/N_{organisch}$ verhouding was na 6 weken nauwelijks veranderd. De concentratie minerale N (voornamelijk $N\text{-}NH_4^+$) daarentegen was na 6 weken significant verlaagd (figuur 20). Bovendien verschilden na 6 weken incubatie ook de mestbehandelingen van elkaar. De -A-EM mest had een significant lagere $N_{mineraal}$ concentratie dan de +A-EM mest. Door het verlies aan minerale N was de C/N_{totaal} ratio van de –A-EM mest in die periode significant toegenomen, terwijl de $C/N_{organisch}$ verhouding nagenoeg gelijk bleef. Bij aanvang van de proef was de verhouding $N_{mineraal}/N_{organisch}$ = 0.8 en verschilde niet tussen de behandelingen. Na 6 weken was deze verhouding in de -A-EM mest significant verlaagd (verlies van minerale N) vergeleken met de +A-EM mest, waarin de ratio niet veranderde (geen verlies van minerale N). Toevoeging van EM had geen aantoonbare effecten op de $N_{mineraal}/N_{organisch}$ verhouding.

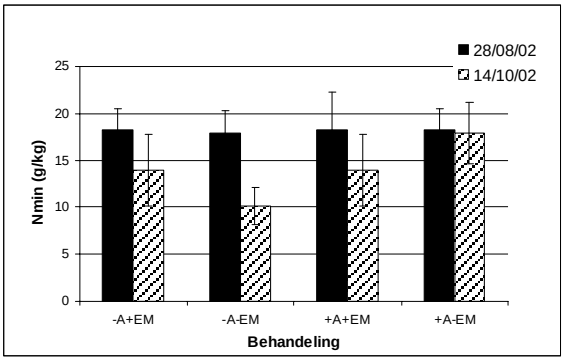


Fig.20. De hoeveelheid minerale stikstof ($N\text{-}NO_3^-$ + $N\text{-}NH_4^+$) aanwezig in de droge mest uit figuur 18.

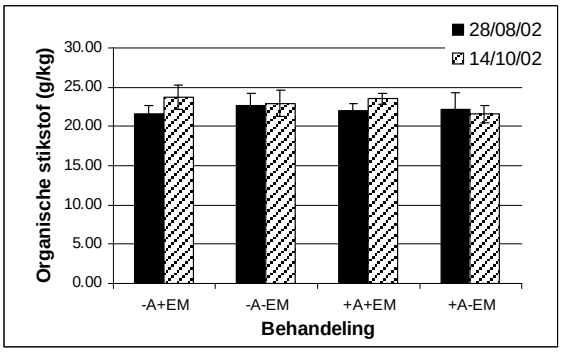


Fig. 21. De hoeveelheid organische stikstof aanwezig in de droge mest uit figuur 18.

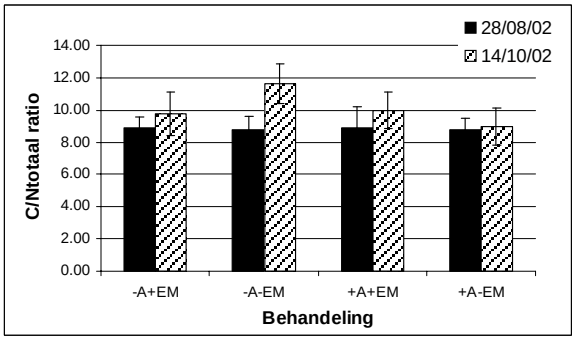


Fig. 22. C/N_{totaal} ratio van de droge mest uit figuur 18.

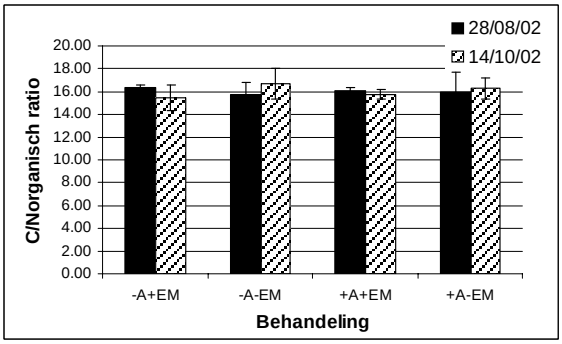


Fig. 23. $C/N_{organisch}$ ratio van de droge mest uit figuur 18.

Conclusies

Het onderzoek heeft aangetoond dat er grote verschillen bestaan in zowel de samenstelling van de EM-Stock als in de EM-Aktiefoplossingen. Dit is niet verwonderlijk. Als een mengsel van tientallen bacteriesoorten wordt toegevoegd aan een suikeroplossing (voedingsmedium) dan valt niet te voorspellen welke soorten zullen gaan overheersen en welke verdwijnen. Hetzelfde is gevonden in proeven waarin grond sterk werd verdund met gesteriliseerde grond. Als de verdunde grond vervolgens werd geïncubeerd bleken er forse verschillen te ontstaan in de bacteriële soortensamenstelling tussen verschillende herhalingen [Griffiths e.a., 2001]. Dit kan worden veroorzaakt doordat soorten die in lage aantallen voorkomen door toeval wel in de ene en niet in de andere herhaling terechtkomen. Ook de twee EM-stockoplossingen die werden gebruikt voor de analyse van onderzoeksvraag 1 bleken behoorlijk van elkaar te verschillen. Met de gebruikte

PCR-DGGE methode is het niet mogelijk alle in de stock aanwezige soorten aan te tonen. Soorten die in zeer lage dichtheden voorkomen (minder dan 1 promille van het totale aantal bacteriën) worden niet zichtbaar in het DNA-bandenpatroon. Het feit dat er in de EM-Aktiefoplossingen meer DNA-banden werden gevonden dan in de stockoplossingen wijst erop dat ook soorten die zeer lage dichtheden hebben in de stockoplossing, behoorlijk kunnen gaan groeien (tot boven de detectielimiet) als ze verse voedingsstoffen krijgen in de EM-Aktiefoplossing. Het opwerken van de EM-Stock naar een EM-Aktiefoplossing is bedoeld om de biomassa van de aanwezige bacteriesoorten te verhogen. In de EM-Aktief werden minimaal 16 en maximaal 35 DNA-banden vastgesteld, terwijl dit in de EM-Stock 12 tot 15 waren. Hieruit volgt dat EM een redelijk aantal bacteriesoorten bevat en dat het 'activeren' van de EM-oplossing kan leiden tot een vergroting van het aantal dominante bacteriesoorten. De maximale diversiteit die in het huidige onderzoek kon worden aangetoond (35 DNA-banden) blijft echter ver achter bij de door de producent vermelde diversiteit van 80 soorten micro-organismen. Wel moet worden opgemerkt dat in dit onderzoek alleen de bacteriën en niet de schimmels en gisten zijn onderzocht.
Toepassing van de geactiveerde EM-oplossing had geen effect op de bacteriële diversiteit in drijfmest. Na 6 weken verschilde de bacteriële diversiteit in mest waaraan wel of geen EM en/of Agri-mest was toegevoegd niet aantoonbaar van elkaar. Opvallend is wel dat een aantal DNA-banden die duidelijk aanwezig waren in de EM-Aktief, niet teruggevonden werden in de mestbehandelingen waaraan het EM-Aktief was toegevoegd. Klaarblijkelijk overleven deze bacteriën niet in de mest of komen zij slechts in zeer lage dichtheden voor. Door de geringe overleving van EM in mest is het niet waarschijnlijk dat ze effectief zijn.

Een van de vragen ten aanzien van het toevoegen van EM-Aktief aan mest was of het de chemische mestkwaliteit zou beïnvloeden. Het huidige onderzoek heeft hiervoor geen enkele aanwijzing gevonden. Wel werden er effecten van Agri-mest vastgesteld. Agri-mest lijkt verlies (vervluchtiging) van minerale N te beperken en dit resulteerde in een verschuiving in de verhouding $N_{mineraal}/N_{organisch}$. Toekomstig onderzoek naar de werking van mestadditieven (Agri-mest, Euro mest-mix) moet meer duidelijkheid geven over het precieze werkingsmechanisme.

3.5 Effect van EM-mest op grasgroei

Inleiding

Het onderzoek naar de overleving van via Effectieve Micro-organismen toegevoegde bacteriën aan mest leverde een viertal typen mest op, namelijk alle combinaties van met of zonder EM en met of zonder Agri-mest (zie paragrafen 2.5 en 3.4). Aan het gebruik van EM wordt een groot aantal gunstige eigenschappen toegeschreven. Zo zou het leiden tot een verbeterde afbraak van organische stof, de vorming van nuttige voedingsstoffen, het vrijkomen van grote hoeveelheden nutriënten, een effectieve compostering van mest en hogere gewasopbrengsten. In een potproef hebben we onderzocht of toepassing van met EM behandelde mest leidt tot een verbeterde gewasgroei.
In paragraaf 3.4 werd geconcludeerd dat EM geen invloed had op de bacteriële samenstelling van de mest. Ook werden er geen effecten op de chemische samenstelling van de mest vastgesteld. Wel werd vastgesteld dat Agri-mest invloed had op de verhouding $N_{mineraal}/N_{organisch}$ in de mest. Onze hypothese is daarom dat we verwachten dat toevoeging van EM aan mest geen invloed zal hebben op de gewasgroei, maar dat er mogelijk wel effecten van Agri-mest zijn te verwachten.

Resultaten

In figuur 24 is de totale gewasopbrengst (totaal van snede 1, snede 2 en wortelmassa na 6 weken) voor de verschillende drijfmestbehandelingen van de potproef weergegeven. De controlebehandeling (grond zonder mest) had de laagste, en de kunstmest (hoge dosering; KAS_{hoog}) de

hoogste gewasproductie. De verschillende drijfmestbehandelingen (met/zonder EM, met/zonder Agri-mest) gaven geen verschillen in gewasopbrengst. De gewasopbrengst in de drijfmestbehandelingen verschilde niet statistisch significant van de controle potten. De stikstofvoorraad in de grond was blijkbaar zo hoog dat het gras gedurende de duur van de proef (55 dagen) geen verminderde groei ondervond ten opzichte van de met drijfmest behandelde potten. Het stikstofgehalte van het gras in de onbemeste behandeling was echter wel significant lager dan in de bemeste potten (figuur 25). Ook voor het N-gehalte in het gewas geldt dat deze het hoogst was in de kunstmestbehandeling.
Toepassing van EM had geen statistisch aantoonbaar effect op de biomassaproductie en het stikstofgehalte van het gewas. Wel was de N-opname in de mestbehandelingen zonder Agri-mest (451±14 mg N per pot) statistisch significant (p=0.008) groter dan met Agri-mest (435±17 mg N per pot).

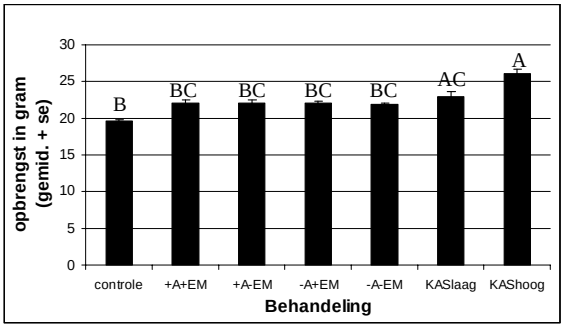


Fig. 24. Totale gewasopbrengsten (Engels raaigras) in g droge stof (totaal van boven- en ondergrondse plantendelen; 1e en 2e snede opgeteld) in de potproef. Controle = geen bemesting; A/EM combinaties = drijfmest soorten; KAS= kalk ammonium salpeter. Staven met verschillende letters zijn statistisch significant verschillend (p<0.05).

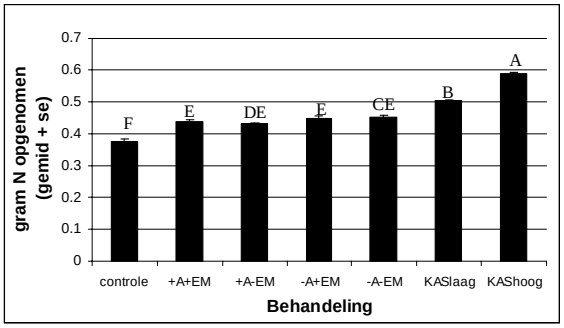


Fig. 25. Opgenomen hoeveelheid stikstof per behandeling in 55 dagen in de proef van figuur 24. Staven met verschillende letters zijn statistisch significant verschillend (p<0.05).

Discussie

EM had geen aantoonbare effecten op de bacteriële diversiteit in de mest en de chemische samenstelling van de mest (paragraaf 3.4). In lijn met die bevindingen konden ook in de potproef geen effecten worden aangetoond van toevoeging van EM op de werkzaamheid van de mest, zoals gemeten in de gewasproductie en stikstofopname door de plant. Wel had ook hier gebruik van Agri-mest een klein effect. In de behandelingen met mest waaraan Agri-mest was toegevoegd was de stikstofopname door het gewas lager dan bij de behandelingen met mest zonder Agri-mest. Verder onderzoek naar het mechanisme van lagere N-verliezen en plantopname door toevoeging van Agri-mest is noodzakelijk.

3.6 Invloed van toevoegmiddelen op de ammoniakemissie uit drijfmest

Inleiding

Ter beperking van de stikstofvervluchtiging uit mest voegen sommige boeren additieven toe aan mest (zie paragraaf 3.4). In dit deelproject is nagegaan wat de invloed is van mestadditieven op de ammoniumconcentratie in drijfmest bij 20 ^{o}C en de ammoniakvervluchtiging uit drijfmest bij verschillende temperaturen.

Resultaten

Macro- en micro-nutriënten in drijfmest
Allereerst werd onderzocht of toepassing van mest-additieven invloed heeft op de mestsamenstelling, in het bijzonder voor de macro-nutriënten NH_4^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} en de micro-nutriënten Cu^{2+} en Zn^{2+}.

Tabel 5. Overzicht van 'totaal en vrije' nutriëntconcentraties in mest waaraan verschillende mestadditieven werden toegevoegd (incubatietemperatuur 20°C). Totaal concentratie werd gemeten via destructie, vrije concentratie met de DMT-manure cel. Tussen haakjes staat de relatieve fractie vrij nutriënt (%).

Onderzocht nutriënt	Totaal concentratie in drijfmest	Onderzocht nutriënt	Concentratie van vrije nutriënten in mestbehandeling:				
			Controle	MX	-A+EM	+A-EM	+A+EM
Macro-nutriënten [mg/l]							
N_{totaal}	2798	NH_4^+	67 (2%)	72 (3%)	62 (2%)	60 (2%)	64 (2%)
Ca	639	Ca^{2+}	39 (6%)	74 (12%)	38 (7%)	33 (5%)	32 (5%)
Mg	443	Mg^{2+}	114 (24%)	133 (31%)	101 (26%)	87 (19%)	117 (25%)
Micro-nutriënten [µg/l]							
Cu	7025	Cu^{2+}	4 (0.06%)	5 (0.07%)	3 (0.04%)	4 (0.06%)	4 (0.06%)
Zn	9120	Zn^{2+}	19 (0.21%)	24 (0.26%)	28 (0.31%)	30 (0.33%)	22 (0.24%)

De fracties vrije micro-nutriënten (Cu^{2+} en Zn^{2+}) zijn, vergeleken met de NH_4^+, Ca^{2+} en Mg^{2+} vrije fracties, laag aangezien deze nutriënten voor het grootste gedeelte gebonden worden in de mest (tabel 5). De onderzochte toevoegmiddelen hadden bij een incubatie bij 20°C geen invloed op de fractie vrij ammonium in mest. Na toevoeging van Euro mest-mix nam de vrije macro-nutriëntconcentratie voor calcium en magnesium significant toe ($p < 0.02$). Wij vermoeden dat deze toename afkomstig is van de toegevoegde Euro mest-mix. Euro mest-mix en andere additieven zullen in de komende twee jaar nader worden onderzocht.

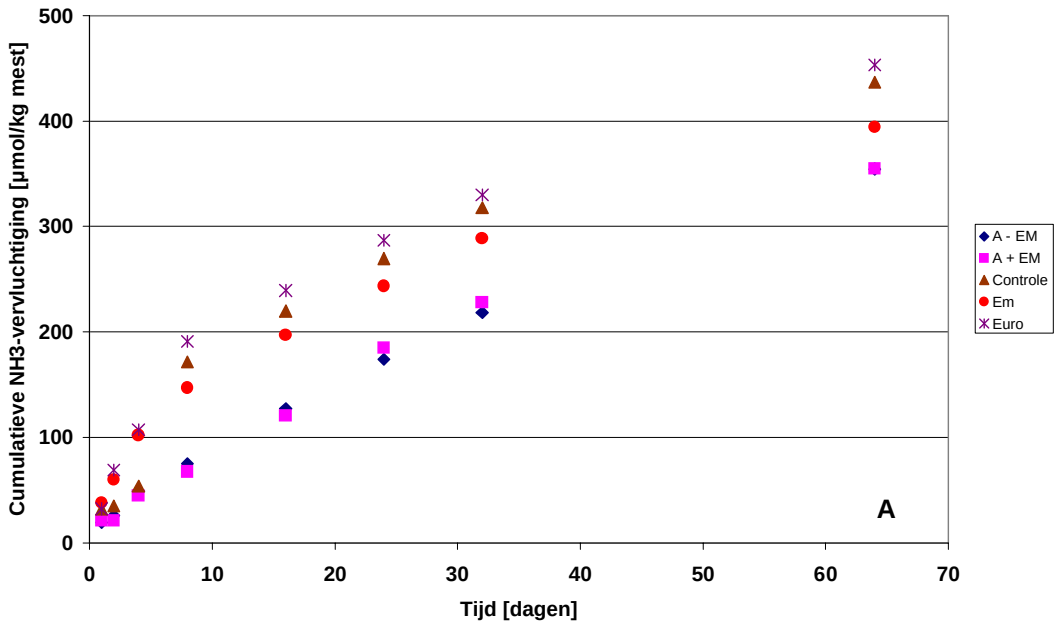
Ammoniakvervluchtiging
De NH_3-vervluchtiging bleek sterk af te hangen van de incubatietemperatuur.
De totale NH_3-vervluchtiging na 16 dagen in de 'niet-roeren' behandeling voor alle mesttypen samen gaf de volgende resultaten:

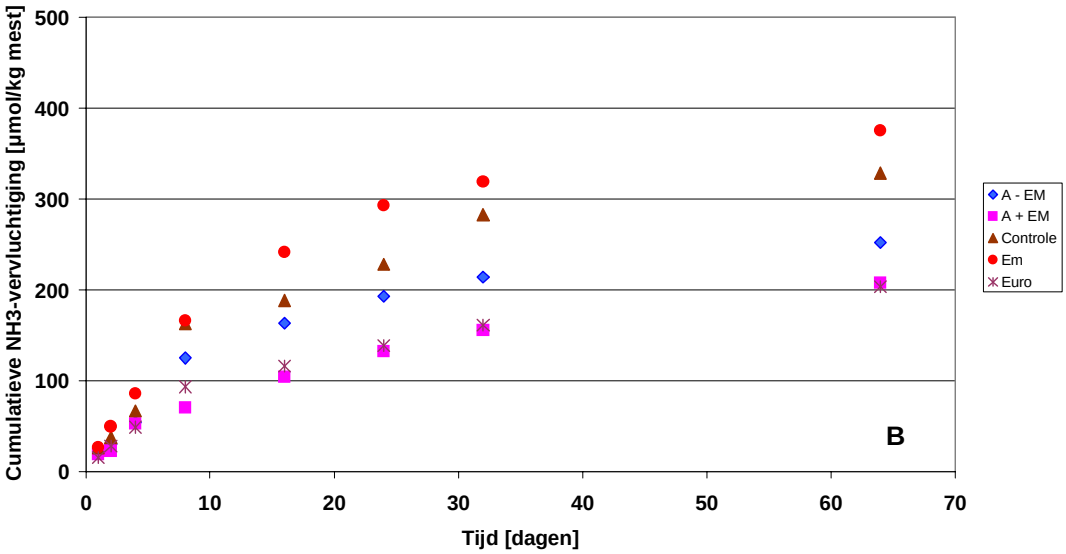
4°C = 100-260 µmol NH_3 vervluchtiging;
20°C = 200-300 µmol NH_3 vervluchtiging;
35°C = 490-750 µmol NH_3 vervluchtiging.;

Bij incubatietemperaturen van 20 of 35 °C hadden de onderzochte toevoegmiddelen nauwelijks effect op de ammoniakvervluchtiging. Echter bij een incubatietemperatuur van 4 °C bestonden er verschillen tussen de verschillende mesttoevoegmiddelen (zie figuur 26).
In alle behandelingen met additieven was na 64 dagen de cumulatieve ammoniakvervluchtiging in de geroerde behandeling hoger dan in de niet-geroerde behandeling ($p<0.0001$). Indien de mest werd geroerd en er Euro mest-mix aan toe was gevoegd werd een iets hogere cumulatieve (4 % toename; ns) ammoniakvervluchtiging gemeten dan in de geroerde controle. Toevoeging

van alleen Agri-mest en/of EM resulteerde in een verlaging van de ammoniakvervluchtiging (reductie van 10-19% na 64 dagen). Deze verschillen waren echter niet statistisch significant.
Na 64 dagen zonder roeren had de Euro mest-mix mest echter een significant lagere cumulatieve ammoniakemmissie dan de controle-mest en de +EM-Agri-mest. Vergeleken met de controlemest reduceerde Euro mest-mix de ammoniakvervluchtiging met 38%. Ook de mesten met Agrimest (met of zonder EM) hadden een lagere ammoniakemissie, maar deze behandelingen verschilden na 64 dagen niet significant van de controle-mest.

Conclusie
De toevoegmiddelen Euro mest-mix, Agri-mest, Effectieve Micro-organismen en Agri-mest met Effectieve Micro-organismen hadden bij een incubatietemperatuur van 20°C nagenoeg geen effect op de verschijningsvormen waarin macro- en micronutriënten in de mest aanwezig zijn.
Ook de ammoniakvervluchtiging bij 20°C werd niet beïnvloed door het gebruik van de toevoegmiddelen. De ammoniakvervluchtiging bleek echter sterk temperatuur afhankelijk. Het toevoegen van additieven om de ammoniakvervluchtiging te reduceren had effect, maar alleen bij lage temperatuur, waarbij het tevens van belang was of de mest al dan niet regelmatig werd geroerd. De effecten van de mestadditieven traden vooral op in de eerste twee weken na toedienen. Alleen het additief Euro mest-mix verlaagde de ammoniakvervluchtiging statistisch significant (t.o.v. controle-mest) en dan alleen wanneer de mest niet werd geroerd.
Bij hogere temperaturen lost minder NH_3 op in water. Ook de bacteriële activiteit, en daarmee de stikstofmineralisatie, zijn temperatuurafhankelijk. Dit verklaart de hoge ammoniakvervluchtiging bij 20, 35 ^{o}C. Bij 4 ^{o}C lost meer NH_3 op in water en is de bacteriële activiteit lager. Onder dergelijke omstandigheden (combinatie van lage temperatuur en lage microbiële activiteit die resulteerde in een sterk gereduceerde totale ammoniakvervluchtiging) waren er effecten van additieven op de ammoniakvervluchtiging waarneembaar, tenminste, zolang er niet in de drijfmest werd geroerd. Roeren (het verstoren van de mest) leidde namelijk tot een verhoging van de ammoniakvervluchtiging, hetgeen de mogelijke effecten van de additieven overschaduwde.





A-EM : wel Agri-mest toegevoegd, maar geen Effectieve Micro-organismen
A+EM: zowel Agri-mest als Effectieve Micro-organismen toegevoegd
Controle: geen additieven toegevoegd
EM: Effectieve Micro-organismen toegevoegd
Euro: Euro mest-mix toegevoegd

Fig. 26. Ammoniakvervluchtiging bij 4 oC in verschillende combinaties van drijfmest en mest-toevoegmiddelen die wel (A) of niet (B) regelmatig werden geroerd.

3.7 Effecten van mestaanwendingsmethodiek op de samenstelling van de bodemfauna in grasland

Inleiding

Boeren zijn verplicht om drijfmest “emissiearm” aan te wenden op het grasland. De technieken die daar geschikt voor zijn, zoals zodenbemesting en mestinjectie, worden allen gekenmerkt door het feit dat ze in meer of mindere mate leiden tot een fysische verstoring van de bovenste centimeters van de bodem. Juist in deze bovenste cm’s van de bodem wordt de hoogste biologische activiteit aangetroffen. Door boeren wordt algemeen verondersteld dat emissiearme uitrijdtechnieken een negatief effect hebben op het bodemleven. Aangezien bodemorganismen een belangrijke rol spelen in de nutriëntendynamiek in de bodem is het van groot belang meer duidelijkheid te verschaffen over de effecten van emissiearme uitrijdtechnieken op de bodembiota.

Het onderzoek in dit werkpakket richt zich op nematoden, potwormen, regenwormen en de springstaarten en mijten. Deze taxonomische groepen van bodemdieren bestaan uit soorten die sleutelposities innemen in het bodemvoedselweb en een belangrijke rol spelen bij de decompositie van organisch materiaal en de nutriëntenkringloop in de bodem.

De volgende hypotheses werden getoetst:

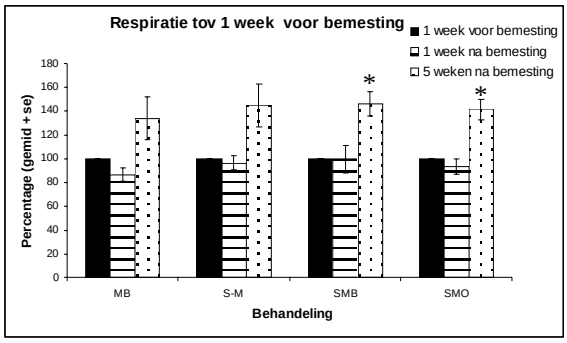
- Toepassing van zodenbemesting zal een negatief effect hebben op het aantal potwormen;
- Toepassing van zodenbemesting zal een negatief effect hebben op het aantal en de soortenrijkdom van regenwormen;
- Het snijden van de sleuven heeft een negatief effect op aantallen regenwormen;
- Toepassing van zodenbemesting zal resulteren in een lagere nematoden Maturity Index;
- Toepassing van zodenbemesting zal een negatief effect hebben op de aantallen en soortenrijkdom van de springstaarten en mijten en binnen beide groepen in het bijzonder op de predatoren.

Resultaten

In onderstaande figuren wordt de volgende codering gebruikt: MB = mest bovengronds toegediend; SMO = mestinjectie; S-M = snijden zonder mesttoediening; SMB = snijden met mest bovengronds toegediend; +EM = met EM-gift; -EM = geen EM-gift.

Biologische bodemactiviteit

In figuur 27 is duidelijk de invloed van het seizoen op de respiratie te zien. In alle behandelingen was de respiratie in mei (ca. 5 mg C/kg droge grond/uur) als gevolg van hogere bodemtemperaturen en grotere gewasgroei hoger dan in maart en april (3-4 mg C/kg droge grond/uur). Zowel mestaanwendingstechniek als EM hadden geen aantoonbaar effect op de respiratie.



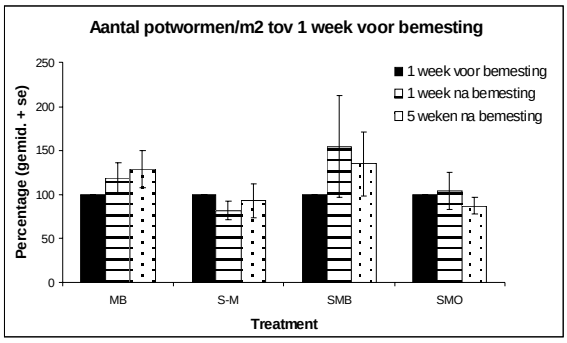


Fig. 27. Bodemrespiratie in de verschillende behandelingen 1 week vóór (werd op 100% gesteld) en 1 en 5 weken nà bemesting. * = significant verschillend van 1e bemonstering.

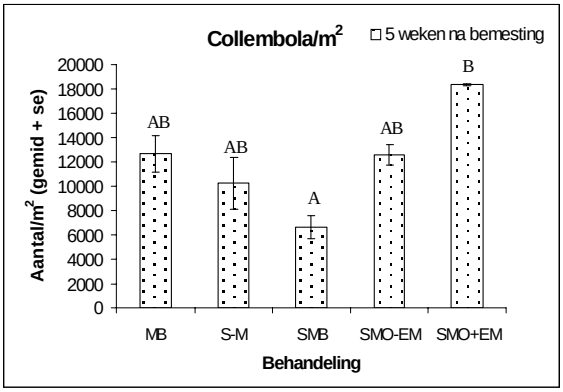
Fig. 28. Aantal potwormen/m^2 in de verschillende behandelingen 1 week vóór (werd op 100% gesteld) en 1 en 5 weken nà bemesting.

Potwormen

In het experiment werd alleen het totaal aantal potwormen bepaald en niet de soortensamenstelling. Populatiedichtheden varieerden van 1.514 (minimum) tot 64.722 potwormen/m^2. Wereldwijd gezien worden ongeveer 25.000 potwormen/m^2 (gemiddeld per jaar) aangetroffen. De gemiddelde dichtheid aangetroffen in de proefvelden (27.270/m^2) komt hier redelijk mee overeen. We vonden geen statistisch significante effecten van de verschillende mestaanwendingsmethoden op de aanwezigheid van potwormen (figuur 28). Blijkbaar zijn de potwormen zodanig klein dat schadelijke effecten als gevolg van het injecteren niet of nauwelijks meetbaar zijn en ondervinden zij geen schade door een eventuele zoutstress vanuit de geïnjecteerde drijfmest.

Mijten en springstaarten

De monsters voor mijten en springstaarten werden genomen 5 weken na bemesting (op 2 mei 2002). Bij de behandeling SMO, zodenbemesting, werd een significant effect gevonden van de toepassing van EM. In de SMO-plots, waarin EM werd toegepast, werden significant meer mijten en springstaarten aangetroffen (zie figuur 29 en 30).



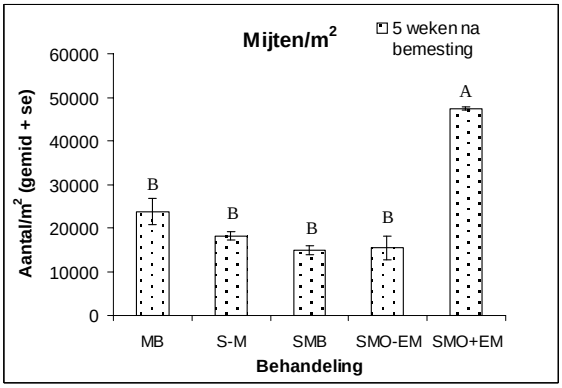


Fig. 29. Het aantal springstaarten (Collembola) per m^2 in de verschillende behandelingen. Staven met verschillende letters zijn statistisch significant verschillend ($p<0.05$).

Fig. 30. Het aantal mijten (Acari) per m^2 in de verschillende behandelingen. Staven met verschillende letters zijn statistisch significant verschillend ($p<0.05$).

Het aantal microarthropoden dat werd gevonden in de behandelingen MB, S-M en SMB en SMO-EM komt overeen met aantallen die bekend zijn van matig tot intensief beheerde graslanden (15.000-35.000/m^2) [Siepel, 1996]. In alle veldjes werd een groot aantal “fungivore browsers” aangetroffen. Dit zijn microarthropoden die van schimmelcellen de celinhoud, maar niet de celwanden consumeren. Dergelijke soorten zijn kenmerkend voor intensief beheerde graslanden [Siepel, 1996].
Er werd geen effect gevonden van het snijden op de mijten- en springstaartenpopulaties. Net als bij de potwormen geldt dat deze bodemorganismen klein zijn en dat schade als gevolg van het snijden daarom minimaal zal zijn. We hebben ook geen effect van zodenbemesting op de trofische groepen van microarthropoden gevonden.

Nematoden
De populatiedichtheden van nematoden werden niet beïnvloed door het wel of niet gebruiken van EM. Voor verdere statistische analyse zijn de +EM en -EM plots van de behandelingen MB en SMO daarom samengevoegd. De gemiddelde populatiedichtheid van het proefveld was $21*10^6$ nematoden/m2, hetgeen binnen de range valt voor intensief beheerde graslanden [Schouten e.a. 1998].
Wat betreft de totale aantallen nematoden hebben we geen effecten van mestaanwendingsmethoden gevonden, maar in de diverse behandelingen vonden in de tijd wel verschillende significante veranderingen plaats. In de behandeling snijden zonder mest (S-M) waren de aantallen nematoden 1 week en 5 weken nà het uitvoeren van de behandeling significant lager (zie figuur 31). Dit was eveneens het geval in de behandeling snijden, mest bovengronds (SMB) 5 weken na bemesten. Een verklaring zou kunnen zijn dat door het snijden de grond rond de sleuf iets is uitgedroogd, waardoor de aanwezige nematoden uitdroogden.

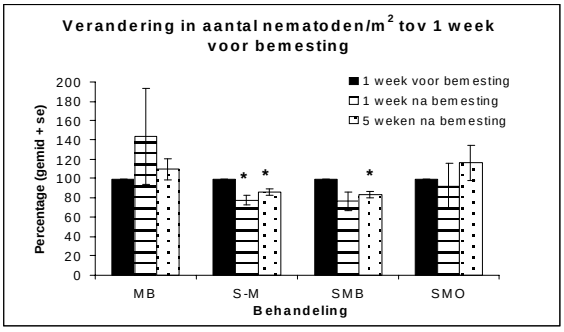


Fig. 31. Het aantal nematoden/m^2 in de verschillende behandelingen 1 week vóór (werd op 100% gesteld) en 1 en 5 weken nà bemesting. * = significant verschillend van 1e bemonstering.

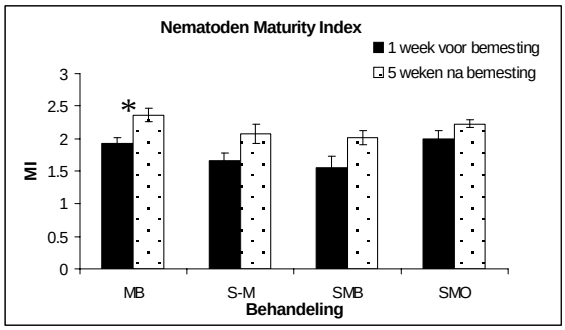


Fig. 32. Nematoden Maturity Index in de verschillende behandelingen 1 week vóór en 5 weken nà bemesting * = 2 bemonsteringsdata zijn significant verschillend.

Bij bestudering van de nematodesoortensamenstelling bleek dat 5 weken na bemesting in alle veldjes de fractie enrichment opportunisten (cp1-soorten) was afgenomen. De grootste afname werd gevonden in de veldjes met bovengrondse bemesting (MB en SMB) en geen bemesting (S-M). Het relatieve belang van schimmeletende nematoden nam toe in deze behandelingen. Dit resultaat is in overeenstemming met eerdere resultaten van dezelfde proefvelden en in percelen van melkveehouderijen elders in Friesland [De Goede e.a. 2003]. Het aantal vrij in de grond levende endo-plantparasitaire nematoden was in de SMO en SMB plots na 5 weken lager dan vóór het bemesten. Als gevolg van het bemesten is het gras zich gaan ontwikkelen en zijn deze nematoden vanuit de grond de graswortels ingegaan. Effecten van zoutstress op de nematoden

lijken niet aanwezig, aangezien de fractie CP3-5 nematoden (zeer gevoelige soorten) in alle behandelingen in week 5 groter was dan vóór het behandelen van de veldjes. Door de veranderingen in de CP1 en CP3-5 soorten was de Maturity Index (figuur 32) voor de behandelingen met bovengrondse mesttoediening 5 weken nà bemesting significant groter. In de zodenbemestingbehandeling daarentegen veranderde de Maturity Index nauwelijks.

Regenwormen

Fig. 33. Regenwormbemonstering: 2002 (links) had een zeer nat voorjaar, terwijl de zomer van 2003 (rechts) perioden met extreme hitte kende.

Effecten van mestaanwendingsmethoden zijn bepaald in het voorjaar van 2002 en in de zomer van 2003. In het voorjaar van 2002 was de grond zeer vochtig met vochtgehaltes van 60% (19/3/02), 45% (4/4/02) en 55% (2/5/02). In de zomer van 2003 was de grond veel droger, vochtgehaltes varieerden van 20% op 1/8/03 en 3/9/03 tot 13% op 12/8/03 (figuur 33). Zowel in het voorjaar van 2002 als in de zomer van 2003 werd een significant effect van het gebruik van EM in de SMO-plots waargenomen. De resultaten van deze 2 behandelingen (SMO-EM en SMO+EM) kunnen daarom niet worden samengenomen en zullen apart in de figuren en tabellen worden weergegeven. Geen effect van EM werd waargenomen in de bovengrondse bemestingsbehandeling (MB); in de behandeling MB werden daarom bij de analyses de +EM en -EM behandeling samengevoegd .
Het aantal regenwormencocons in de grond in de verschillende behandelingen werd alleen onderzocht in het voorjaar van 2002 en alleen in de week vóór de bemesting en 5 weken erna (figuur 34). Er lijkt sprake te zijn van een toename van coconaantallen in de behandeling zonder snijden en een afname van het aantal/m^2 in de behandelingen met snijden + mest (onafhankelijk van plaatsing). De variatie binnen de behandelingen was echter zodanig groot, dat mogelijke effecten van behandelingen niet statistisch kunnen worden aangetoond.

Het aantal regenwormen dat in het voorjaar van 2002 werd aangetroffen in de plots was hoog; de hoogste dichtheid was 600 wormen/m^2. De gemiddelde populatiedichtheid in dit voorjaar was 450 wormen/m^2. In de zomer van 2003 waren de populatiedichtheden in de verschillende plots veel lager, gemiddeld werden er 250 wormen/m^2 aangetroffen. Gemiddeld over het hele jaar is de regenwormendichtheid in de plots nog altijd hoger dan het wereldwijde jaarlijkse gemiddelde voor graslanden (250 wormen/m^2).

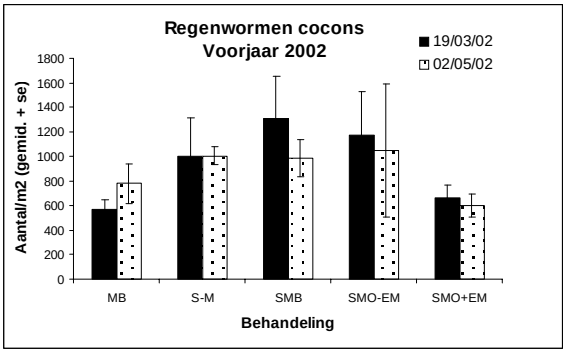


Fig. 34. Verloop van de aantallen cocons/m^2 in de verschillende behandelingen 1 week vóór en 5 weken nà de bemesting in het voorjaar van 2002.

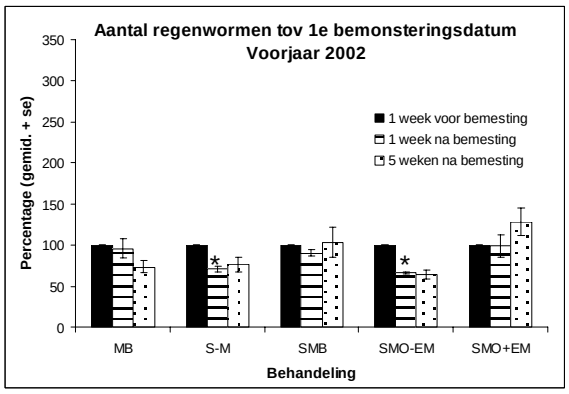


Fig. 35. Totaal aantal regenwormen in de verschillende behandelingen in het voorjaar van 2002 1 week vóór (werd op 100% gesteld), 1 week nà en 5 weken nà de bemesting. * = significant verschillend van 1e bemonstering.

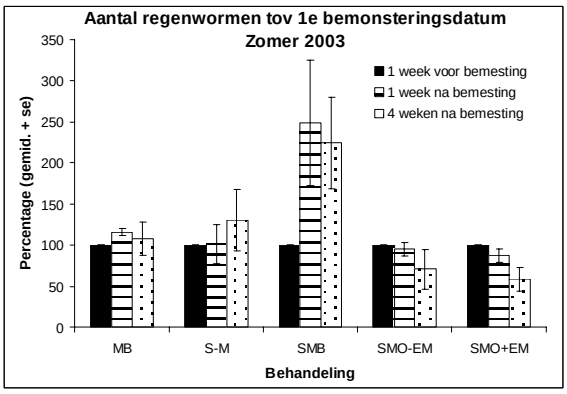


Fig. 36. Totaal aantal regenwormen in de verschillende behandelingen in de zomer van 2003 1 week vóór (werd op 100% gesteld), 1 week nà en 5 weken nà de bemesting.

In het voorjaar van 2002 werden in de behandelingen ‘Snijden zonder mest’ (S-M) en ‘Zodenbemesting zonder EM’ (SMO-EM) na het uitvoeren van de behandeling minder regenwormen aangetroffen (figuur 35). Mechanische schade als gevolg van het snijden van de sleuven en het eventueel plaatselijk uitdrogen van de grond kunnen een rol hebben gespeeld. In de behandeling zonder mest is ook de verminderde aanvoer van voedsel waarschijnlijk een oorzaak. Het lijkt erop dat het gebruik van het additief EM het negatieve effect van zodenbemesting op de totale aantallen regenwormen in het voorjaar van 2002 neutraliseerde.

In de zomer van 2003 (figuur 36) leken de behandelingen ‘snijden en bovengrondse bemesting’(SMB) en de zodenbemestingsbehandelingen (SMO+EM en SMO-EM) van elkaar te verschillen. De variatie tussen plots met dezelfde behandeling was echter groot en aantallen gevonden regenwormen waren als gevolg van de droogte laag, zodat alle behandelingen en tijdstippen niet significant van elkaar verschilden.

Tabel 6. Gevonden regenwormsoorten in de verschillende behandelingen en hun ecologische classificatie. x = aangetroffen, - = niet aangetroffen.

Soort	voorjaar 2002	zomer 2003	Ecologisch type
volwassen wormen			
Allolobophora chlorotica	x	-	endogeen
Aporrectodea caliginosa	x	x	endogeen
Aporrectodea rosea	x	x	endogeen
Aporrectodea antipae	x	x	endogeen
Aporrectodea longa	x	x	anecique
Lumbricus terrestris	x	x	anecique
Lumbricus rubellus	x	x	epigeen
Lumbricus castaneus	x	-	epigeen
juveniele wormen			
Allolobophora chlorotica	x	x	endogeen
Aporrectodea caliginosa	x	x	endogeen
Aporrectodea rosea	x	x	endogeen
Aporrectodea antipae	x	x	endogeen
Aporrectodea longa	x	x	anecique
A. spec	x	x	?
Lumbricus terrestris	x	x	anecique
Lumbricus rubellus	x	x	epigeen
Lumbricus castaneus	x	x	epigeen
L. spec.	x	x	?

Regenwormen kunnen worden onderverdeeld in 3 ecologische typen: epigene, endogene en anecique wormen. De epigene wormen komen vooral in de bovenste paar cm van de bodem voor en voeden zich met het aanwezige organische materiaal dat op en in de bodem aanwezig is. Endogene wormen komen in het minerale deel van de grond voor, komen nooit aan de oppervlakte en voeden zich met het organisch materiaal dat vermengd is met minerale grond. Anecique wormen zijn wormen die diepe verticale gangen maken; zij verplaatsen organisch materiaal dat op het bodemoppervlak ligt de grond in en voeden zich daarmee. We verwachten dat vooral de epigene wormen direct (bijv. door het snijden van de sleuf) beïnvloed zullen worden door de verschillende mestaanwendingstechnieken; de andere 2 typen wormen zitten te diep in de bodem om enige directe effecten van de verschillende methoden te ondervinden. In tabel 6 zijn de thans gevonden soorten regenwormen en hun ecologische typering weergegeven. In figuur 37 en 38 is de fractie epigene regenwormen (totaal van volwassen en juveniele wormen) in het voorjaar van 2002 en in de zomer van 2003 in de verschillende behandelingen weergegeven.
Allereerst valt op dat in het voorjaar 2002 de fractie epigene wormen veel groter was dan in de zomer van 2003. Dit verschil is veroorzaakt door de droogte in de zomer van 2003, waardoor veel minder wormen en zeker veel minder epigene (oppervlakkig levende) wormen aanwezig waren.

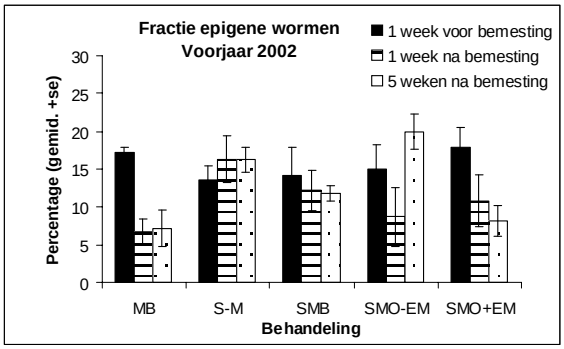


Fig. 37. Fractie epigene wormen (volw. +juv.) in de verschillende behandelingen in het voorjaar van 2002.

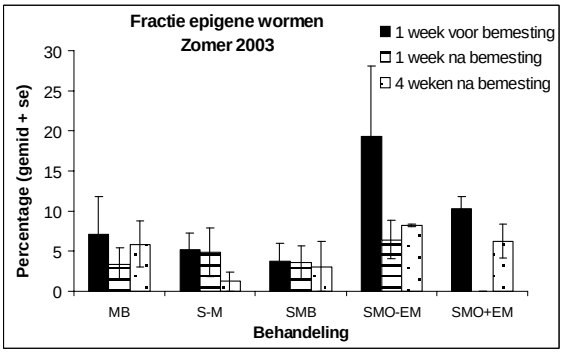


Fig. 38. Fractie epigene wormen (volw. +juv.) in de verschillende behandelingen in de zomer van 2003.

In het voorjaar van 2002 nam in alle bemeste behandelingen de fractie epigene wormen na mesttoediening af. In al deze behandelingen vonden we na bemesten een significant lager aantal juveniele *Lumbricus rubellus* wormen. In het voorjaar was de grond zeer vochtig en is het mogelijk dat de drijfmest een toxische invloed heeft uitgeoefend op het voorkomen van de juvenielen van deze soort. Meer onderzoek is echter nodig om deze mogelijke toxische effecten van mest op regenwormen en de mogelijke werkingsmechanismen die hierachter schuil gaan te kunnen inschatten.

In de zomer van 2003 was het aantal epigene wormen vanwege de droogte al erg laag. Op de 2^{e} en 3^{e} bemonsteringsdatum werden nauwelijks volwassen epigene wormen gevonden (figuur 39). Omdat dit ook optrad in de plots met snijden zonder mesttoediening, verwachten we dat het verdwijnen van deze adulten een gevolg was van de droogte en niet van een bepaalde mestaanwendingsmethode.

Bodemprofiel met boven de graszode en onderin een regenworm in diapauze

Detailopname van regenworm in diapauze

Fig. 39. Regenworm in diapauze in de zomer van 2003.

Conclusies

Door de heterogeniteit in de bodem en de grote variatie in populatiedichtheid en soortensamenstelling van de verschillende groepen bodemorganismen is het moeilijk effecten van mestaanwendingsmethoden zichtbaar te maken. Uit dit onderzoek naar de effecten van mestaanwendingsmethoden op bodemdieren kan geconcludeerd worden dat eventuele effecten van de verschillende methoden op de activiteit van micro-organismen en op potwormenaantallen niet aantoonbaar zijn. Ook op nematodendichtheden en nematodensoortensamenstelling zijn effecten van mestaanwendingstechnieken moeilijk aan te tonen. Echter bij het bovengronds verspreiden van de mest werden relatief meer schimmelconsumerende nematoden aangetroffen en was de Maturity Index hoger dan in de andere behandelingen. Net als werd gevonden door De Goede e.a. [2003] was ook in het huidige onderzoek de verandering in de Maturity Index 5 weken na bemesten het laagst bij zodenbemesting. Samen met de veranderingen in het voorkomen van de plantenparasitaire nematoden duiden deze veranderingen in de samenstelling van de nematodengemeenschap op verschillen in nutriëntendynamiek in de velden die via verschillende mestaanwendingsmethoden werden bemest [De Goede e.a., 2003].

Op grond van de resultaten van het onderzoek kan niet worden geconcludeerd dat de methode van mestaanwending (bovengrondse verspreiding versus zodenbemesting) een groot effect heeft op aantallen regenwormen en de regenwormensoortensamenstelling. Dit in tegenstelling tot een onderzoek op 12 boerderijen van De Goede e.a. [2003] dat in percelen met zodenbemesting een hoger aantal regenwormen aantrof dan in percelen met bovengrondse drijfmesttoediening. In de percelen met zodenbemesting vonden De Goede e.a. [2003] hogere aantallen pendelaars (anecique wormen) en minder oppervlakkig levende wormen (epigene wormen). In het hier besproken experiment vonden we dat het snijden van sleuven tot een verlaging van het totale aantal regenwormen in de behandelingen ‘snijden zonder mest’ en ‘zodenbemesting zonder EM’ in perioden dat hoge aantallen regenwormen aanwezig waren, leidde. Mechanische schade als gevolg van het snijden van de sleuven en eventueel het plaatselijk uitdrogen van de grond kunnen hierbij een rol hebben gespeeld.

Het bemesten van grasland had onder natte omstandigheden kortstondig negatieve effecten op het aantal oppervlakkig levende (epigene) regenwormen. Vooral jonge regenwormen van de soort *Lumbricus rubellus* verdwenen door het verspreiden van mest, deze verdwijning leek niet afhankelijk te zijn van de plaatsing van de mest (bovengronds dan wel geïnjecteerd).

Bodemdieren kunnen een significante bijdrage leveren aan de mineralisatie van stikstof uit de organische gebonden fractie. Over het algemeen leveren regenwormen een substantiële bijdrage aan de mineralisatie van organische stof. In akkerbodems wordt de bijdrage van regenwormen aan de N-mineralisatie geschat op 30-40 kg ha^{-1} jr^{-1} [Didden e.a., 1994, Curry e.a., 1995, Whalen e.a., 2000]. Regenwormdichtheden in grasland zijn doorgaans veel groter dan in akkerland, zodat de bijdrage van regenwormen aan de mineralisatie ook veel groter zal zijn. In het onderzochte proefveld waren de regenwormdichtheden groter dan het wereldwijde gemiddelde van 250 wormen/m^2. Dit betekent dat regenwormpopulaties in de onderzochte velden substantieel bijdragen aan de mineralisatie van de organische stof. Een kleine afname in het aantal wormen als gevolg van bemesting zal naar verwachting daarom een reductie in de mineralisatie tot gevolg hebben. Maar omdat na mestinjectie nog relatief hoge aantallen regenwormen aanwezig waren, verwachten wij dat deze reductie slechts minimale gevolgen zal hebben voor de productiviteit van het grasland.

3.8 Communicatie

De publiciteit rondom het mineralenproject VEL & VANLA in 2002 en 2003 was enorm. Niet alleen hebben landelijke dagbladen zoals De Volkskrant, Trouw en Het Financiële Dagblad aandacht besteed aan het project, maar ook provinciale en nationale radiostations, kranten, agrarische vakbladen en als klapper het NOS Journaal van zes en acht uur op 20/9/03. Daarnaast zijn er honderden boeren, beleidsmedewerkers, voorlichters, studenten, docenten, be-

stuurders, politici, etc. op excursie geweest of zijn projectmedewerkers en deelnemers uitgenodigd voor een lezing. Vele boeren zijn in navolging van VEL & VANLA met studiegroepen gestart. Al met al is de beoogde “olievlekwerking” vanuit het gebied naar de rest van Nederland meer dan bewerkstelligd!

3.8.1 *Publiciteit*

Natuurlijk in balans

Onder deze naam heeft het mineralenproject een magazine uitgegeven met een tijdloos karakter en van goede kwaliteit, zodat de gebruiker deze bewaart en het ook in te zetten is als cursusmateriaal. Deze keuze bleek een schot in de roos. In de serie “Natuurlijk in Balans” zijn 6 uitgaven verschenen, steeds met een andere thematische invalshoek (tabel 7).

Tabel 7. Verschijningsdata en oplagen van ‘Natuurlijk in Balans’**.**

Thema	Datum	Oplage
Bodem	aug. 2002	2000
Voeding	nov. 2002	4000*
Bemesting	feb. 2003	3500
Grasland	april 2003	3000
Maatschappij	juni 2003	2500
Kringloop	dec. 2003	2500

* Wegens grote belangstelling zijn er een half jaar later 1000 bijgedrukt

Bij de eerste uitgave van het magazine is begonnen met een vaste verzendlijst van 450 adressen. Inmiddels staan meer dan 1000 boeren en geïnteresseerden op de verzendlijst van het magazine en worden de overige exemplaren uitgedeeld tijdens excursies, lezingen, studiegroepbijeenkomsten e.d. In zowel het themanummer "Bodem" als het themanummer "Kringloop" zijn resultaten vanuit het SKB-project gecommuniceerd. Het magazine met als thema “Maatschappij” is ook verstuurd naar openbare gelegenheden zoals gemeentehuizen, banken, recreatiecentra, VVV’s etc. in de regio.

Nieuwsbrief

De Interne Nieuwsbrief, in eerste instantie bedoeld voor de 60 projectdeelnemers, is in de betreffende periode 10 maal verschenen. Dit medium fungeert zeer goed als regelmatig informatiebulletin aangaande de actuele stand van zaken en activiteiten binnen het project. Naast de projectdeelnemers wordt de Interne Nieuwsbrief verzonden aan projectmedewerkers, betrokken onderzoekers, overige betrokkenen en geïnteresseerden in geheel Nederland (ca. 120 adressen).

Geschreven pers

In de afgelopen 2 jaar heeft het Mineralenproject meerdere malen de publiciteit gehaald. Getuige de vele krantenartikelen is de nieuwswaarde van het project groot. Zeer regelmatig is in Het Landbouwblad (verspreid onder alle leden van de NLTO) verslag gedaan van resultaten en werden deelnemers met resultaten geportretteerd. Daarnaast is in diverse vakbladen (Oogst, Boerderij, Veldpost, Agrarisch Dagblad, e.d.), de lokale pers en de landelijke pers (De Volkskrant, Trouw, Het Financiële Dagblad) uitgebreid over het project geschreven.

Publicatie in vaktijdschrift Bodem

Bodem is een Nederlandstalig vaktijdschrift dat informatie-uitwisseling en discussie over duurzaam bodembeheer ten doel heeft. Nummer 4 van augustus 2002 had als thema Landbouw en Bodem. Hierin staat een bijdrage vanuit het VEL & VANLA Mineralenproject, nl. “Een veranderde visie op bodemkwaliteit binnen de melkveehouderij: het VEL & VANLA mineralenproject” [De Goede, R.G.M., F.P.M. Verhoeven & T. Hoeksma, 2002 (4): 136-138].

Advertenties in Het Landbouwblad
Sinds begin 2003 verschijnt er in “Het Landbouwblad” (wekelijks nieuwsblad voor agrariërs in Noord Nederland, uitgegeven door de NLTO) een advertentie getiteld “Nieuws van VEL & VANLA”. De advertentie is 1 A4 groot en om de 3 weken worden actuele zaken uit het VEL & VANLA project voor het voetlicht gebracht. In tabel 8 wordt van elk artikel weergegeven wat de verschijningsdatum was en welk thema het artikel had.

Tabel 8. Verschijningsdata en thema's van VEL & VANLA advertenties in ‘Het Landbouwblad’.

Verschijningsdatum	Thema
8 maart 2003	Bemesting
29 maart 2003	Voeding
19 april 2003	Bodem en organische stof
10 mei 2003	Graslandbeheer
31 mei 2003	Bodemleven
21 juni 2003	Grasanalyses
12 juli 2003	Ureum

Knipselkrant
Alle artikelen die over het project in de pers verschijnen worden verzameld en op regelmatige basis doorgestuurd aan betrokkenen bij het VEL & VANLA project. De knipselkrant is 5 keer verschenen.

Website
De website www.velvanla.nl is als informatiemedium sinds begin maart 2002 in de lucht. Via een “content management systeem” kunnen regelmatig nieuwsberichten en bedrijfs- en onderzoeksgegevens worden toegevoegd. In 2003 zijn 2 rekenmodules toegevoegd. Een rantsoenberekeningsprogramma om een eiwitarm rantsoen uit te rekenen en een bemestingstool om binnen de huidige regelgeving de maximale bemesting uit te rekenen. De website heeft tot nu toe ruim 6000 hits gehad, er staan 99 personen ingeschreven op de mailinglijst, waarvan: 27 boeren, 22 onderzoekers en 50 overige geïnteresseerden.

Televisie en radio
Via de provinciale televisie en radio (Omroep Fryslân) zijn een aantal maal deelnemers van het project en de projectleiders aan het woord geweest om uit te leggen waar men mee bezig is en wat de resultaten zijn. Daarnaast heeft op 19 mei Radio 1 FM projectdeelnemer Foppe Nijboer geïnterviewd. Op zaterdag 20 september is in zowel het zes als het acht uur journaal een item van 2 minuten gewijd aan het mineralenproject en de resultaten.

Bezoek Minister van Landbouw
Minister Cees Veerman van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij heeft op 27 september 2002 een speech gegeven ter gelegenheid van het 10-jarig bestaan van VEL & VANLA. Voor de tekst van de speech kan de web-site van het Ministerie van LNV worden geraadpleegd: *http://www.minlnv.nl/actueel/speech/2002/speech060.htm* De pers heeft uitgebreid bericht over de happening, zie knipselkrant.

Boek: Boeren in Balans
In mei 2003 is door uitgeverij ‘Roodbont’, in opdracht van en in samenwerking met Mineralenproject VEL & VANLA, het boek getiteld ‘Boeren in balans‘ met als ondertitel: ‘praktijkgids voor een gezonde melkveehouderij’ uitgegeven. Dit boek gaat in op alle facetten van de VEL & VANLA-aanpak, waaronder structuurrijk en eiwitarm voeren, verbeteren van het bodemleven en de waar-

de van goede mest. Kaders met praktische tips, opdrachten en achtergrondinformatie wisselen elkaar af. Daarnaast komen in het boek verschillende melkveehouders (voornamelijk projectdeelnemers) en adviseurs aan het woord.
Het boek is toegezonden aan alle projectdeelnemers, betrokkenen, financiers van het mineralenproject, relaties en belanghebbenden (in totaal ca. 400 adressen). De uitgever toont zich zeer tevreden over de vraag vanuit de boerenpraktijk. De oplage bedraagt 2500 stuks. Het boek is te verkrijgen via uitgeverij Roodbont of via NLTO Projecten en wordt regelmatig geadverteerd in landelijke vakbladen.

Kwartetspel
Speciaal voor de themadag 'Boeren in Balans' is een kwartetspel ontwikkeld, waarmee op een speelse manier de VEL & VANLA-methode wordt uitgedragen. Het kwartetspel is verspreid onder aanwezigen tijdens deze dag en wordt in het project gebruikt als kennisverspreidingsmiddel. Het kwartetspel is enthousiast ontvangen.

3.8.2 *Excursies, bijeenkomsten & voordrachten*

Huiskamerbijeenkomsten
Gedurende de jaren zijn er vele zogenaamde huiskamerbijeenkomsten georganiseerd. Een huiskamerbijeenkomst vindt plaats op één van de deelnemende bedrijven en er zijn hooguit 6 andere deelnemers (vaak buren) bij betrokken. Tijdens de huiskamerbijeenkomst wordt gediscussieerd over verschillende thema's. De deelnemers uit het gebied verkrijgen nieuwe kennis en wisselen kennis met elkaar uit tijdens de bijeenkomsten. De thema's liepen uiteen van voeding, bemesting en bodem tot economie en bedrijfsontwikkeling. Het idee om in kleine groepjes op regelmatige basis bij elkaar te komen en de bedrijfsvoering door te praten en bij te stellen sloeg heel erg aan.

Veldbijeenkomst Bodembiologie
Petra van Vliet en Bert van der Stelt verzorgden een workshop over bodembiologie. Aan de bodembiologie-workshop namen ongeveer 15 personen deel. Na een korte inleiding konden de boeren zelf bodemdieren onderzoeken in grond van hun eigen bedrijf (figuur 40). Ook werd er gezamenlijk naar regenwormen gezocht in een graslandperceel van het bedrijf waar de workshop werd georganiseerd (figuur 41).

Fig. 40. Bodemdieren bestuderen in boerenschuur tijdens workshop.

Fig. 41. Wormen zoeken tijdens workshop.

Groepsbijeenkomsten
Voor de projectdeelnemers zijn tijdens het project de volgende themabijeenkomsten georganiseerd:

31 augustus2001	Officiële startbijeenkomst voor de deelnemers
17 en 26 oktober 2001	Themabijeenkomst voeding: samenstelling eiwitarme en structuurrijke rantsoenen m.b.v. computerprogramma (4 groepen)
15 januari 2002	Excursie Koeien en Kansen bedrijf: Eggink
7 maart 2002	Presentatietraining voor deelnemers
25 februari 2002	Themabijeenkomst diergezondheid
13 maart 2002	Excursie voor deelnemers: Verschillende systemen van koeien voeren om meer inzicht te krijgen in de mogelijkheden, onder leiding van Bernard Simons
15 maart 2002	Aftrap van project, met lezing door de Rector Magnificus van Wageningen Universiteit: Bert Speelman
21 maart 2002	Presentatietraining deelnemers
9 april 2002	Bijeenkomst over de mogelijkheden van internettoepassingen: zoals www.ureumnet.nl en www.boerderijnet.nl
1 juli 2002	Bijpraat-avond excursiebedrijven
12 juli 2002	Veldbijeenkomst bodem (bodembiologie en klaver)
10 september 2002	Presentatie relatie voeding – mestkwaliteit door Joan Reijs
20 februari 2003	Themabijeenkomst over de Fokkerij in het VEL & VANLA-gebied
26 februari 2003	Excursie naar “Koeien en Kansen’ deelnemer en naar PMOV-lid
3 april 2003	Themabijeenkomst over diergezondheid
17 april 2003	Themadag ‘Boeren in Balans” in Oenkerk
11 juni 2003	Cursus bedrijfsvisie
9 juli en 20 augustus 2003	Bijeenkomst over bedrijfseconomie
19 en 20 september 2003	Slotmanifestatie

Excursies deelnemers
De deelnemers hebben meerdere malen de mogelijkheid gekregen hun blik te verruimen door op excursie te gaan naar melkveehouderijbedrijven buiten het VEL & VANLA-gebied. Het betrof vaak deelnemers aan andere projecten (Praktijkcijfers, Koeien en Kansen, PMOV), waardoor er veel informatie uitgewisseld kon worden.

Excursies naar het VEL & VANLA-gebied
De mogelijkheid bestaat voor boeren uit de rest van Nederland om VEL & VANLA te bezoeken. Onder de titel “Zien is geloven” zijn in totaal ca. 270 boeren naar VEL & VANLA toegekomen. Een bezoek betekent in de ochtend een inleiding door de projectleiding en in de middag een bedrijfsbezoek naar één van de deelnemers. De excursies worden erg goed gewaardeerd.

Naast excursies voor boeren zijn er diverse excursies voor studenten van Wageningen Universiteit, Van Hall Instituut en AOC’s naar het VEL & VANLA-gebied georganiseerd (ruim 200 studenten). Daarnaast worden regelmatig excursies verzorgd voor provinciebestuurders, LNV-ers, ambtenaren, politieke partijen e.d. In totaal zijn 602 personen op excursie geweest

Figuur 42 geeft in percentages weer hoe de verdeling per doelgroep was.

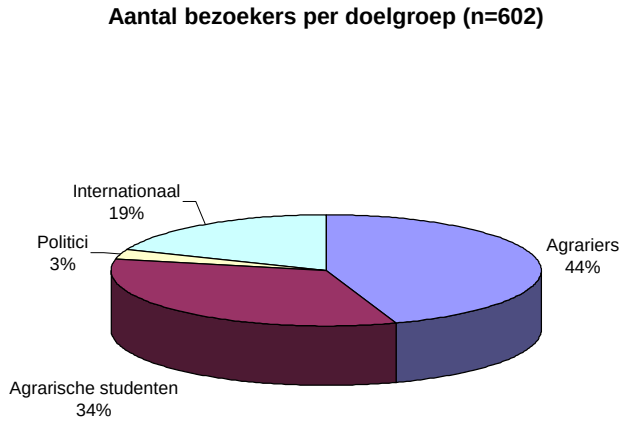


Fig. 42. Bezoekers van excursies naar VEL & VANLA opgesplitst naar beroepsgroep of herkomst.

Ter ondersteuning van het begeleiden van excursies ontvingen de projectdeelnemers in december 2002 een white-board met opdruk van de 'Mineralenkringloop'. Hiermee kan de mineralenkringloop van het bedrijf aanschouwelijk gemaakt worden. Deze borden dienen tevens als 'visitekaartje' voor de bedrijven, waarmee de kennisverspreiding gestimuleerd wordt. Voor de excursiebedrijven (15 in totaal) is ook een cursus "presenteren" verzorgd.

De excursies werden overigens niet alleen door Nederlandse boeren bezocht, er werden ook groepen uit Duitsland, België, Frankrijk, Italië, Zwitserland, Letland, Zuid-Afrika en Indonesië ontvangen.

Cursussen
De cursus "Meer vertrouwen in mest en ruwvoer" is in juni 2002 aangeboden aan veehouders in Noord Nederland. In totaal hebben negen groepen (102 agrariërs) aan de cursus deelgenomen. In de cursus volgden de deelnemers een jaarrond programma van 6 dagdelen, waarin de kennis en resultaten uit het mineralenproject VEL & VANLA uitgewisseld werden.

Themadag: Boeren in Balans
Ter gelegenheid van het uitbrengen van het boek is een themadag georganiseerd op de landbouwpraktijkschool in Oenkerk. Doel was boeren uit Noord Nederland op de hoogte te brengen van de resultaten uit het Mineralenproject. Na een aantal lezingen, onder andere van Frank Verhoeven en de deelnemende melkveehouder Foppe Nijboer, zijn verschillende thematische workshops georganiseerd. Een van de workshops ging over "de rol van bodembiologie op het agrarisch bedrijf". De dag was erg succesvol, er kwamen zo'n 100 melkveehouders en het leverde veel publiciteit op (zie knipselkrant).

Hetzelfde concept is een paar weken daarna herhaald in Herenveen voor alle intermediaren in Noord Nederland (voerleveranciers, boekhouders, docenten etc.). Deze dag trok zo'n 50 belangstellenden.

Stage- en afstudeeropdrachten.

Voortdurend zijn studenten (HBO) d.m.v. stage of via afstudeeropdrachten betrokken bij het project. In 2002 en 2003 hebben 5 studenten middels hun stage het projectteam ondersteund in de dataverzameling en analyse. Er zijn 6 afstudeervakstudenten actief geweest met de onderwerpen: bedrijfseconomie, bemesting en diergezondheid.

Lezingen en colleges
Vanuit het hele land komen verzoeken van boeren, beleidsmedewerkers, agribusiness en andere geïnteresseerden om voordrachten te houden over de aanpak, ervaringen en resultaten van het Mineralenproject. De projectleiding, betrokken onderzoekers en deelnemers verzorgen deze lezingen. Bij Wageningen Universiteit, Van Hall Instituut en AOC Friesland zijn een aantal colleges verzorgd over het Mineralenproject VEL & VANLA.

Regelmatig worden Frank Verhoeven, Ron de Goede en Lijbert Brussaard uitgenodigd om te spreken op seminars. Bijvoorbeeld in september 2002 op een door de DLV (Dienst Landbouw Voorlichting) georganiseerd seminar met de titel: “Bodemvruchtbaarheid: alternatieven en nieuwe inzichten, waar moeten we naar toe?” Ron de Goede heeft hier een voordracht gehouden getiteld: Bodemorganismen in landbouwgronden en hun bijdrage aan de voedselvoorziening van het gewas.

Naar schatting zijn op deze manier meer dan 1500 boeren bereikt en 2000 overige geïnteresseerden.

HOOFDSTUK 4

CONCLUSIES

Ontwikkeling DMT-manure cel (paragraaf 3.1)

- De nieuw ontwikkelde DMT-manure cel blijkt een goed instrument om vrije nutriëntenconcentraties in drijfmest te meten.
- Binnen 7 dagen wordt een Donnan membraan-evenwicht bereikt. Het transport van ionen over het DMT-manure cel-membraan is hierbij de snelheidsbeperkende stap.
- Rondpompen van de acceptoroplossing is niet noodzakelijk, omdat het nauwelijks van invloed is op de tijdsduur van evenwichtsinstelling.

Effect rantsoensamenstelling op microbiële gemeenschap in mest (paragraaf 3.2)

- Verschillen in ruw eiwitgehalte en energieniveau in de rantsoenen leiden tot verschillen in mestkwaliteit.
- In alle mesten was de bacteriële diversiteit hoog.
- De mesten vertoonden grote overeenkomsten in bacteriesoortensamenstelling.
- De relatieve samenstelling van de bacteriegemeenschap werd vooral gestuurd door het ruw eiwitgehalte van het rantsoen.
- De hoeveelheid aanwezige koolstof en stikstof, tezamen met mogelijke predatie door protozoën in de mest bepaalt de activiteit van bacteriën in de mest.

Effect rantsoensamenstelling op ammoniakvervluchtiging uit drijfmest (paragraaf 3.3)

- Hogere ruw eiwitgehaltes in de rantsoenen zorgden voor een toename van de zoutsterkte van de mest en voor een stijging van de pH.
- Rantsoenen met een hoger ruw eiwitgehalte leidden tot een grotere fractie vrij ammonium in drijfmest.
- De ammoniakvervluchtiging was het laagst in mesten met de laagste concentratie vrij ammonium.
- De hoogste ammoniakvervluchtiging trad op in mest van rantsoenen met een hoog ruw eiwitgehalte en een lage energie-inhoud.

Overleving van Effectieve Microörganismen in drijfmest (paragraaf 3.4)

- Vergelijking van de bacteriële diversiteit van twee EM-stocks toonde aan dat de stocks substantieel van elkaar verschilden.
- DNA-onderzoek ('fingerprints') toonde aan dat de EM-stocks uit een beperkt aantal (enkele tientallen) bacteriesoorten bestonden.
- Activering van een EM-Stock oplossing tot een EM-Aktief oplossing door incubatie leidde tot een verhoging van het aantal dominante bacteriesoorten.
- Geen van de dominante bacteriesoorten die uniek waren voor de EM-Aktief oplossing kon worden teruggevonden in de mest.
- Toevoeging van EM-Aktief had geen significant effect op de samenstelling van de bacteriële gemeenschap in de mest.
- Toevoeging van EM-Aktief had geen aantoonbare effecten op de $N_{mineraal}/N_{organisch}$ verhouding in de mest.
- Agri-mest kan van invloed zijn op het voorkomen van minerale stikstof in mest.

Effect van Effectieve Microörganismen op gewasgroei (paragraaf 3.5)

- Toepassing van EM had geen statistisch aantoonbaar effect op de biomassaproductie en de stikstofopname van het gewas (*Lolium perenne*) in een potproef.
- In aanwezigheid van Agri-mest was de stikstofopname door het gewas significant lager dan zonder Agri-mest.

Effect van mesttoevoegmiddelen op de ammoniakemissie (paragraaf 3.6)

- De toevoegmiddelen Euro mest-mix, Agri-mest en EM hadden bij 20 ^{o}C geen aantoonbaar effect op de verschijningsvormen waarin de macro-nutriënten NH_4^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} en de micro-nutriënten Cu^{2+} en Zn^{2+} in de mest aanwezig waren.
- Ammoniakvervluchtiging neemt toe bij een toenemende temperatuur.
- Euro mest-mix reduceerde de ammoniakvervluchtiging bij 4 ^{o}C indien de mest niet werd geroerd. Toepassing van Agri-mest resulteerde in vergelijkbare effecten, maar deze waren net niet significant.

Effect van mestaanwendingstechnieken op bodemfauna (paragraaf 3.7)

- Bij gebruik van mest met het additief Euro mest-mix had toepassing van verschillende mestaanwendingstechnieken geen aantoonbare effecten op bodemrespiratie, potwormen en nematoden aantallen.
- De nematodengemeenschap en de Maturity Index veranderden na bemesting met Euro mest-mix mest. De fractie enrichment opportunisten (cp1-soorten) was in alle veldjes afgenomen. Het relatieve belang van schimmeletende nematoden nam toe in deze behandelingen met bovengrondse bemesting. Deze veranderingen in de samenstelling van de nematodengemeenschap duidden op verschillen in nutriëntendynamiek.
- In 2 van de 3 behandelingen met snijden (nl. ‘snijden zonder mest’ en ‘zodenbemesting zonder EM’) vonden we een verlaging van het totale aantal regenwormen in het natte voorjaar van 2002. Dit effect werd niet gevonden in de droge zomer van 2003. Effecten van zodenbemesting met Euro mest-mix mest op regenwormdichtheden zijn klaarblijkelijk alleen aantoonbaar als hoge aantallen regenwormen aanwezig zijn.
- Afname van aan de oppervlakte levende regenwormen als gevolg van het snijden van sleuven kon worden aangetoond wanneer grote aantallen regenwormen aanwezig waren.
- Bemesten van grasland met Euro mest-mix mest onder natte weersomstandigheden leidde tot een verlaging van de dichtheid aan juveniele aan de oppervlakte levende regenwormen.

Communicatie (paragraaf 3.8)

- Het VEL & VANLA Mineralenproject heeft landelijke bekendheid gekregen via ruime aandacht in de dag- en weekbladen en de nationale en regionale televisie.
- Via een groot aantal populaire, Nederlandstalige, vakinhoudelijke publicaties zijn de aanpak en resultaten van het VEL & VANLA Mineralenproject onder de aandacht van een groot deel van de Nederlandse melkveehouderij gebracht.
- Via excursies werden ruim 600 personen vertrouwd gemaakt met het VEL & VANLA Mineralenproject.
- Er werd een bodembiologieworkshop georganiseerd voor boeren uit het project.
- In totaal werden meer dan 1500 boeren en 2000 overige geïnteresseerden bereikt.

LITERATUUR

Bloem, J., M. Veninga & J. Shepherd 1995. Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. Applied and Environmental Microbiology 61: 926-936.

Bongers, A.T.M. (1985). De nematoden van Nederland. Stichting Uitgeverij Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging. Uitgeverij Pirola, Schoorl.

Bongers, A.T.M. (1990). The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. Oecologia 83: 14-19.

Curry, J.P., D. Byrne & K.E. Boyle (1995). The earthworm population of a winter cereal field and its effects on soil and nitrogen turnover. Biology and Fertility of Soils 19: 166-172

De Goede, R.G.M., L. Brussaard & A.D.L. Akkermans (2003). On-farm impact of cattle slurry manure management on biological soil quality. Netherlands Journal of Agricultural Sciences 51: 103-133.

De Goede, R.G.M., F.P.M. Verhoeven & T. Hoeksma (2002). Het VEL & VANLA-mineralenproject: een veranderde visie op bodemkwaliteit binnen de melkveehouderij. Bodem 4: 136-138.

Didden, W.A.M., J.C.Y. Marinissen, M.J. Vreeken-Buijs, S.L.G.E. Burgers, R.D. Fluiter, M. Geurs & L. Brussaard (1994). Soil meso- and macrofauna in two agricultural systems: factors affecting population dynamics and evaluation of their role in carbon and nitrogen dynamics. Agric. Ecosyst. Environ. 51: 171-186.

Dilly,O., J. Bloem, A. Vos & J. C. Munch (2004). Bacterial diversity during litter decomposition in agricultural soils. Applied and Environmental Microbiology 70, 000-000. In druk.

Dubbeldam, R. (2000). De sporen van twee milieucoöperaties. Drukkerij Modern, Bennekom. 44 pp.

Erisman, J.W. (2000). De vliegende geest: ammoniak uit de landbouw en de gevolgen voor de natuur. Beta Text, Bergen, 271 pp.

Griffiths, B.S., K. Ritz, R. Wheatly, H.L. Kuan, B. Boag, S. Christensen, F. Ekelund, S.J. Sørensen, S. Muller & J. Bloem (2001). An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. Soil Biology and Biochemistry 33: 1713-1722.

Higa, Teruo (1998). Effectieve Micro-organismen. Voor een duurzame landbouw en een gezond milieu. Uitgeverij Jan van Arkel, Utrecht.

Huijsmans, J.F.M., J.M.G. Hol & B.R. Verwijs (in prep). Ammoniakemissie bij bovengronds breedwerpige mesttoediening. IMAG Nota 2003-15

Michel, P.H. & J. Bloem (1993). Conversion factors for estimation of cell production rates of soil bacteria from thymidine and leucine incorporation. Soil Biology and Biochemistry 25: 943-950.

O'Connor, F. B. (1955). Extraction of enchytraeid worms from a coniferous forest soil. Nature 175: 815-816.

Peters, H.T.A. (1999). Ervaringen met het Agriton systeem. Onderzoeksresultaten en praktijkervaringen. Verslag Agriton.

Schouten, A.J., M.L.P. van Esbroek & J.R.M. Alkemade (1998). The nematode fauna in sandy soil grasslands of farms with dairy-cattle in The Netherlands. In R.G.M de Goede & T. Bongers (eds) Nematode communities of northern temperate grassland ecosystems. p 277-283

Siepel, H. (1996). Biodiversity of soil microarthropods: the filtering of species. Biodiversity and Conservation 5: 251-260.

Van Egeraat, A.W.S.M. (1998). EM1 en de groei van micro-organismen. Verslag van een studie in opdracht van de firma Agriton. Bron: http://www.agriton.nl/emroned.html

Verhoeven, F.P.M., J.W. Reijs & J.D. van der Ploeg (2003). Re-balancing soil-plant-animal interactions: towards reduction of nitrogen losses. Netherlands Journal of Agricultural Sciences 51: 147-164.

Whalen, J.K. & R.W Parmelee (2000). Quantification of nitrogen assimilation efficiences and their use to estimate organic matter consumption by the earthworms *Aporrectodea tuberculata* (Eisen) and *Lumbricus terrestris* L. Applied Soil Ecology 13: 199-208.