

# De invloed van denitrificatie in sedimenten op het stikstofgehalte van oppervlaktewateren

## Inleiding

De bruikbaarheid van oppervlaktewater voor de landbouw, de industrie, de recreatie en de drinkwatervoorziening wordt nadelig beïnvloed door een massale ontwikkeling van algen in het oppervlaktewater. Daar algen naast licht voor hun energievoorziening, anorganische nutriënten gebruiken voor hun celsynthese, kan de groei van deze micro-organismen worden gelimiteerd door het beperken van tenminste één van hun groeifactoren. Hiervoor komen fosfaat en in mindere mate stikstofverbindingen het



DR. IR. J. F. VAN KESSEL  
Laboratorium voor Microbiologie,  
Wageningen\*

meest in aanmerking.

Momenteel blijft in Nederland de zuivering van huishoudelijk en industrieel afvalwater hoofdzakelijk beperkt tot het reduceren van de zuurstofbehoefte. De anorganische nutriënten, waaronder fosfaat en stikstofverbindingen, blijven in voldoende grote hoeveelheden in het te lozen effluent achter om op grote schaal algengroei in het ontvangende water te kunnen veroorzaken. De verwijdering van fosfaat uit effluent vindt in Nederland reeds op kleine schaal plaats. Stikstofverbindingen, speciaal nitraat, worden maar in enkele gevallen doelbewust uit het effluent verwijderd, zodat met de lozing van effluent een behoorlijke hoeveelheid stikstofverbindingen in het ontvangende water terecht komen.

In de landbouw wordt in toenemende mate gebruik gemaakt van kunstmeststoffen. In het bijzonder in de akkerbouw heeft een hoge stikstofbemesting relatief hoge nitraatconcentraties tot 50 mg N/l in het drainage-water tot gevolg (Kolenbrander, 1969), waardoor de lozing van drainagewater op oppervlaktewater als een bijdrage tot de eutrofiëring van dat water wordt beschouwd. Hierdoor is in sommige kringen de mening ontstaan dat het gebruik van meststoffen, in het bijzonder stikstofhoudende kunstmeststoffen moet worden beperkt en in sommige gebieden zelfs dient te worden afgeschaft (o.a. Commoner, 1971).

Het hier te bespreken onderzoek had tot doel de bacteriologische omzettingen van stikstofverbindingen in oppervlaktewater te bestuderen, in het bijzonder voor zover ze verband houden met de verlaging van het stikstofgehalte van dit milieu. Van de

\* Momenteel werkzaam bij het Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Directoraat-Generaal voor de Milieuhygiëne, Leidschendam.

TABEL I - Enkele chemische gegevens van de sedimenten A en B (gemiddelde met de spreiding berekend over alle gebruikte monsters) uitgedrukt in mg per g vochtig sediment.

	Sediment	
	A	B
Droge stof	676 ± 143	755 ± 33
Org. stof	28,6 ± 12,4	11,0 ± 2,2
Amm.stikstof	0,43 ± 0,35	0,03 ± 0,01
Org. stikstof	0,96 ± 0,43	0,24 ± 0,09
pH	7,61 ± 0,16	7,26 ± 0,21

hiervoor in aanmerking komende processen werd vooral aan denitrificatie gedacht, omdat hierdoor nitraat (eindproduct van de mineralisatie van organische N-verbindingen) en nitriet in gasvormige N-producten wordt omgezet die in de atmosfeer verdwijnen en zodoende niet beschikbaar zijn voor de celsynthese van algen (moleculaire stikstofbindende blauwwieren uitgezonderd). Aangezien denitrificatie een anaëroob proces is en oppervlaktewater meestal aëroob is, werd gedacht aan de mogelijkheid van denitrificatie in het anaërobe sediment dat zich als regel op de bodem van oppervlaktewater bevindt.

Voor het bestuderen van de denitrificatie werd in laboratorium-experimenten als model-systeem natuurlijk sediment met een bovenstaande laag water gebruikt. Hiervoor werden twee totaal verschillende typen sediment gebruikt. Het ene (A) was afkomstig uit een sloot waarop gezuiverd afvalwater van een kalvermesterij wordt geloosd, het andere (B) uit een sloot die drainagewater afvoert uit een akkerbouwgebied. De gebruikte monsters sediment werden door middel van enkele chemische analyses gekarakteriseerd (tabel I). Hieruit blijkt dat sediment A als rijk aan organische stof en stikstofverbindingen kon worden aangemerkt en sediment B arm. Om de invloed van algen op de bacteriële stikstofomzettingen uit te schakelen, werden alle laboratoriumexperimenten in het donker uitgevoerd.

## Beïnvloeding denitrificatiesnelheid

De uitwisseling van nitraat tussen water en sediment is belangrijk voor het verlopen van denitrificatie in het sediment. Onder normale omstandigheden en ook in de laboratoriumexperimenten vindt geen massatransport van water in het sediment plaats. Hierdoor blijft diffusie als belangrijkste drijvende kracht voor het transport van nitraat over. De diffusiesnelheid is afhankelijk van de concentratie van nitraat in het bovenstaande water en de diffusiecoëfficiënt. Deze laatste is lager in het sediment dan in het bovenstaande water, daar het sediment slechts gedeeltelijk bestaat uit water en omdat de watergevulde capillairen veelal geen rechte, verticale verbindingen in het

sediment vormen. Naast diffusie treedt ook transport van nitraat vanuit het bovenstaande water in het sediment op door menging in het sediment. Hiermee wordt bedoeld dat kleine volumina interstitieel water mechanisch worden verplaatst uit hun oorspronkelijke locatie, waardoor een directe uitwisseling ontstaat tussen het interstitieel water en het bovenstaande water. Deze 'menging' kan ontstaan door (a) de beweging van water direct boven het watersediment grensvlak, (b) het vrijkomen van gasbellen uit het sediment en (c) door het omwoelen van het sediment door bodemorganismen. Het zal duidelijk zijn dat in laboratorium-experimenten weinig invloed is te verwachten van het transport door 'menging'. De denitrificatiesnelheid in een water-sediment systeem wordt gedefinieerd als de hoeveelheid nitraatstikstof (mg) welke per dag per m<sup>2</sup> sedimentoppervlak verdwijnt uit het bovenstaande water. Achtereenvolgens zal nu de invloed van de temperatuur, het zuurstofgehalte en het nitraatgehalte in het bovenstaande water op de denitrificatiesnelheid in de beide sedimenten A en B worden beschreven.

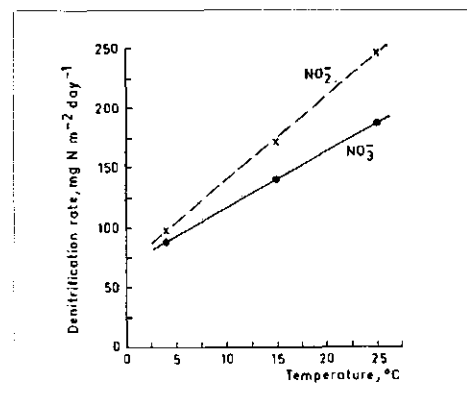
## Temperatuur

Na toevoeging van nitraat of nitriet aan een water-sediment-systeem startte bij 4 °C de denitrificatie pas na een langdurige adaptatietijd, terwijl de nitrificatie niet waarneembaar op gang kwam. Bij 15 °C en in het bijzonder 25 °C verliepen beide processen goed.

Om de denitrificatiesnelheid te kunnen meten, werd de oxydatie van het uit het sediment diffunderende ammonium door nitrificerende bacteriën geremd met behulp van N-Serve (2-chloro-6-(trichloromethyl)pyridine; Sommer, 1972). Ook in de nog te bespreken experimenten werd veelvuldig gebruik gemaakt van N-Serve.

De invloed van de temperatuur op de

Afb. 1 - De relatie tussen de temperatuur en de denitrificatiesnelheid in een water-sediment-systeem waarbij het bovenstaande water op tijdstip  $t = 0,25$  mg l<sup>-1</sup> nitraat- of nitraatstikstof bevatte.



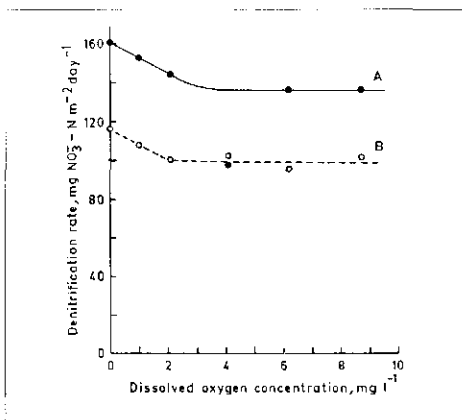
denitrificatiesnelheid komt tot uiting in afbeelding 1. Tussen 4 en 25 °C nam de denitrificatiesnelheid voor zowel nitraat als nitriet evenredig toe met de temperatuur, waarbij de verdwijningssnelheid van nitriet voor elke temperatuur hoger was dan die van nitraat. Een voor de hand liggende verklaring voor dit laatste is dat voor de anaërobe verademing van een zekere hoeveelheid substraat minder nitraat dan nitriet noodzakelijk is, omdat nitraat gedurende de reductie tot moleculaire stikstof 5 en nitriet 3 electronen per ion kan opnemen. Een andere mogelijke verklaring kan zijn dat nitriet door zowel nitraat- als nitrietreducerende bacteriën wordt omgezet. Van sommige nitrietreducerende bacteriën is namelijk bekend dat zij geen nitraat kunnen reduceren (Vangnai en Klein, 1974).

**Het zuurstofgehalte in het bovenstaande water**

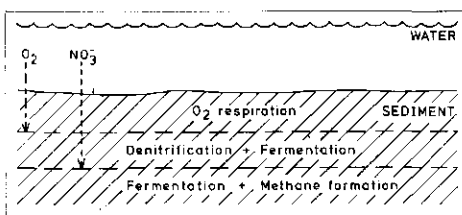
Bij een toenemend zuurstofgehalte in het bovenstaande water van 0 tot ongeveer 3 mg l<sup>-1</sup> nam de denitrificatiesnelheid in de sedimenten A en B af (afb. 2). Bij een verder toenemend zuurstofgehalte nam de denitrificatiesnelheid niet verder af. Dat de denitrificatiesnelheid in sediment A steeds lager was dan in B wordt verklaard door het hogere organische stofgehalte in A (tabel I). Indien zuurstof en nitraat in het bovenstaande water aanwezig zijn, zullen beide componenten in het sediment diffunderen. In de bovenste laag van het sediment kunnen de bacteriën alleen zuurstof als electronen-acceptor gebruiken, omdat de denitrificatie volledig door zuurstof wordt geremd. Denitrificatie vindt dus plaats in een dieper gelegen laag sediment waarin geen zuurstof aanwezig is (afb. 3). Bij een toenemend zuurstofgehalte kan een dikker bovenste laagje sediment met zuurstofverbruik worden verwacht. Hierdoor neemt de transportweg van het nitraat tot de sedimentlaag met denitrificatie toe, waardoor de denitrificatiesnelheid in toenemende mate wordt belemmerd. Op onverklaarbare wijze bleek deze redenering alleen bij zuurstofgehalten tot 3 mg l<sup>-1</sup> overeen te stemmen met de resultaten uit de experimenten.

**Het nitraatgehalte in het bovenstaande water**

In beide sedimenten bleek de denitrificatiesnelheid afhankelijk te zijn van de nitraatconcentratie in het bovenstaande water. Bij lage concentraties een lineaire afhankelijkheid benaderend om geleidelijk bij hogere concentraties onafhankelijk te worden van de nitraatconcentratie (afb. 4). Empirisch benaderde de denitrificatiesnelheid de Michaelis-Menten kinetiek voor nitraatconcentraties, hoewel daarbij direct dient



Afb. 2 - De invloed van de opgeloste zuurstofconcentratie in het bovenstaande water op de denitrificatiesnelheid in de sedimenten A en B. Temperatuur 25 °C; nitraatsikstofconcentratie op tijdstip t = 0 25 mg l<sup>-1</sup>.



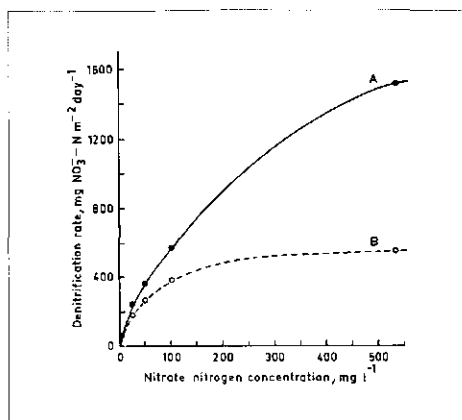
Afb. 3 - Het voorkomen van 3 zones met verschillende microbiologische activiteit in een sediment met bovenstaand water dat zowel nitraat als zuurstof bevat.

te worden opgemerkt dat de omstandigheden in het sediment nauwelijks beantwoorden aan de voorwaarden van deze theorie.

**Immobilisatie van stikstof door denitrificerende bacteriën**

Tijdens de denitrificatie gebruiken de betrokken micro-organismen een zekere hoeveelheid stikstof voor de synthese van celmateriaal (immobilisatie). De geïmmobiliseerde stikstof kan afkomstig zijn uit organische, ammonium- en/of nitraatstikstof. Immobilisatie van nitraatstikstof betekent

Afb. 4 - De invloed van de nitraatconcentratie in het bovenstaande water op de denitrificatiesnelheid in de sedimenten A en B. De incubatietemperatuur bedroeg 25 °C.



dat dit nitraat niet werkelijk verdwijnt uit het water-sediment-systeem, daar deze stikstof na mineralisatie weer vanuit het sediment in de waterfase kan diffunderen en dan alsnog beschikbaar komt voor algen en waterplanten.

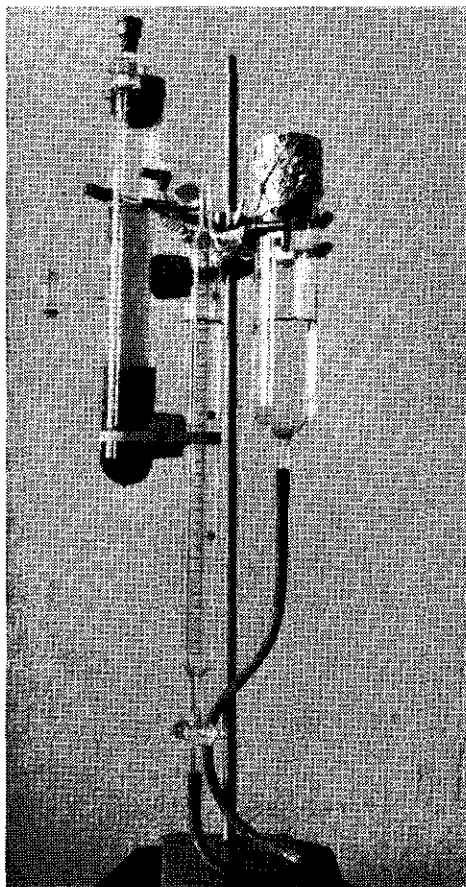
Teneinde deze immobilisatie van nitraat door denitrificerende bacteriën te kunnen meten, zijn laboratoriumexperimenten met de sedimenten A en B uitgevoerd, waarbij anaërobe water-sediment-systemen met gelabelde stikstofverbindingen (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-<sup>15</sup>N en NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-<sup>15</sup>N) werden geïncubeerd bij 25 °C.

Uit de resultaten bleek dat de toegevoegde nitraatstikstof hoofdzakelijk verdween uit het bovenstaande water als gevolg van denitrificatie in het sediment, namelijk 97,2 % in sediment A en 94,5 % in sediment B. Het overige gedeelte, respectievelijk 2,8 en 5,5 %, werd omgezet in organische stof en ammonia. Naast nitraatstikstof werd door de denitrificerende bacteriën tijdens het denitrificeren ook ammoniumstikstof geïmmobiliseerd, namelijk 7,3 % in sediment A en 4,1 % in sediment B als percentage van de toegevoegde hoeveelheid nitraatstikstof. De totale hoeveelheid stikstof die werd geïmmobiliseerd als gevolg van de nitraattoevoeging was in beide sedimenten ongeveer gelijk aan 10 % van de toegevoegde hoeveelheid nitraatstikstof. Het relatief hoge percentage van het geïmmobiliseerde nitraat in sediment B (5,5 %) t.o.v. dat in sediment A (2,8 %) wordt veroorzaakt door het relatief lage ammoniumgehalte in B vergeleken met A (tabel 1).

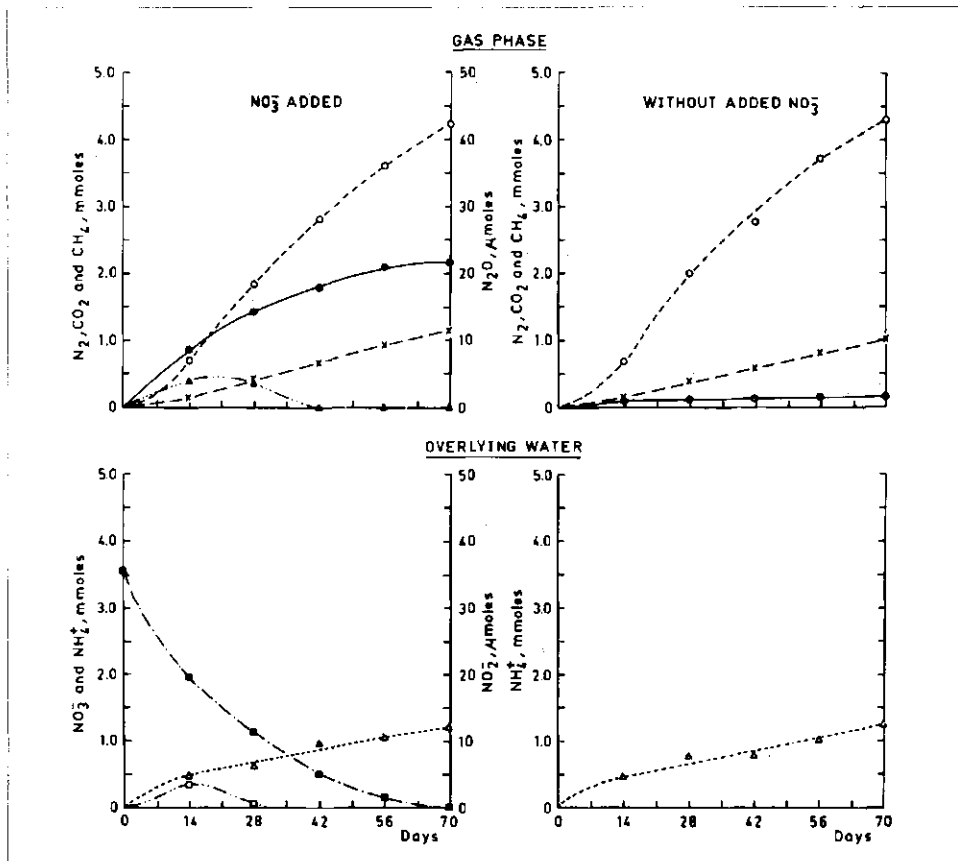
**Gasproductie in sedimenten in aan- en afwezigheid van nitraat**

Informatie over de gasproductie in sedimenten werd verkregen uit experimenten met anaërobe water-sediment-systemen in speciaal daarvoor geconstrueerde gasdichte glazen apparaten (afb. 5). Het water-sediment-systeem bestond uit 90 g vochtig sediment met daarboven 200 ml water dat al of niet 50 mg nitraatstikstof bevatte. Het geheel werd geïncubeerd bij 25 °C. In dit artikel zullen alleen de resultaten van de experimenten met sediment A worden gepresenteerd en besproken.

Met een gemiddelde snelheid van 585 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Nm<sup>-2</sup> dag<sup>-1</sup> verdween binnen 70 dagen al het toegevoegde nitraat uit het bovenstaande water (afb. 6). Uit de figuur blijkt dat de CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> productie niet duidelijk beïnvloed werd door de aanwezigheid van nitraat in het bovenstaande water. Hierbij moet opgemerkt worden dat bij sediment B dat armer is aan organische stof een hogere CO<sub>2</sub> en een lagere CH<sub>4</sub> productie in aanwezigheid van nitraat werd gevonden. Hoewel NO een bekend intermediair is van het denitrificatieproces (Walker en Nicholas,



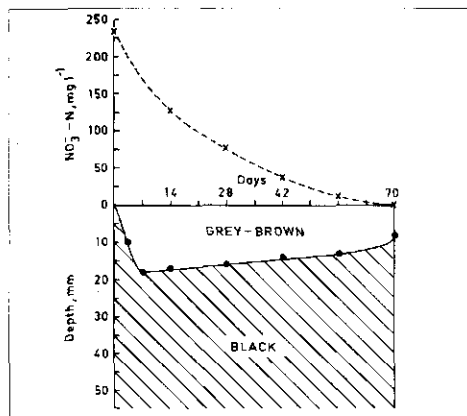
Afb. 5 - Het glazen apparaat waarmee de gasproductie van een water-sediment-systeem bij atmosferische druk kan worden gemeten en waarmee de gasfase en het bovenstaande water zonder luchttoetreding kon worden bemonsterd.



Afb. 6 - De hoeveelheden  $N_2$ ,  $N_2O$ ,  $CH_4$  en  $CO_2$  in de gasfase en  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$  en  $NH_4^+$  in het bovenstaande water van een afgesloten anaëroob water-sediment-systeem met sediment A met en zonder toegevoegd nitraat tijdens incubatie bij 25 °C.

● — ●  $N_2$ ; ▲ — ... — ▲  $N_2O$ ; ○ — ... — ○  $CH_4$ ; X — — X  $CO_2$ ; ■ — — ■  $NO_3^-$ ; □ — ... — □  $NO_2^-$ ; Δ — ... — Δ  $NH_4^+$ .

1961), kan het niet in de gasfase worden aangetoond. Hierdoor was de volgorde van de verschillende stikstofcomponenten die vrijkwamen tijdens de denitrificatie:  $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ . Uit afb. 6 kan worden afgeleid dat de reductiestap van  $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$  sneller verloopt dan die van  $NO_2^- \rightarrow N_2O$  en deze weer sneller verloopt dan die van  $N_2O \rightarrow N_2$ . Tijdens de incubatie bleef de kleur van het sediment zonder nitratoevoeging zwart, terwijl de kleur in de bovenlaag van het sediment met toegevoegd nitraat grijsbruin kleurde (afb. 7). Deze verkleuring kan worden toegeschreven aan de oxydatie van het zwartgekleurde FeS waarbij nitraat werd gebruikt als electronenacceptor. Uit deze verkleuring is af te leiden dat het nitraat tijdens de incubatie niet dieper dan ongeveer 2 cm in het sediment diffundeerde.



Afb. 7 - De diepteverdeling van het grijsbruin gekleurde sediment A en de concentratie van nitrastikstof in het bovenstaande water gedurende de incubatie.

X — — X Nitrastikstof in het bovenstaande water;  
● — ● Grenslijn van de grijsbruin gekleurde laag sediment.

### Redoxpotentiaal en denitrificatie

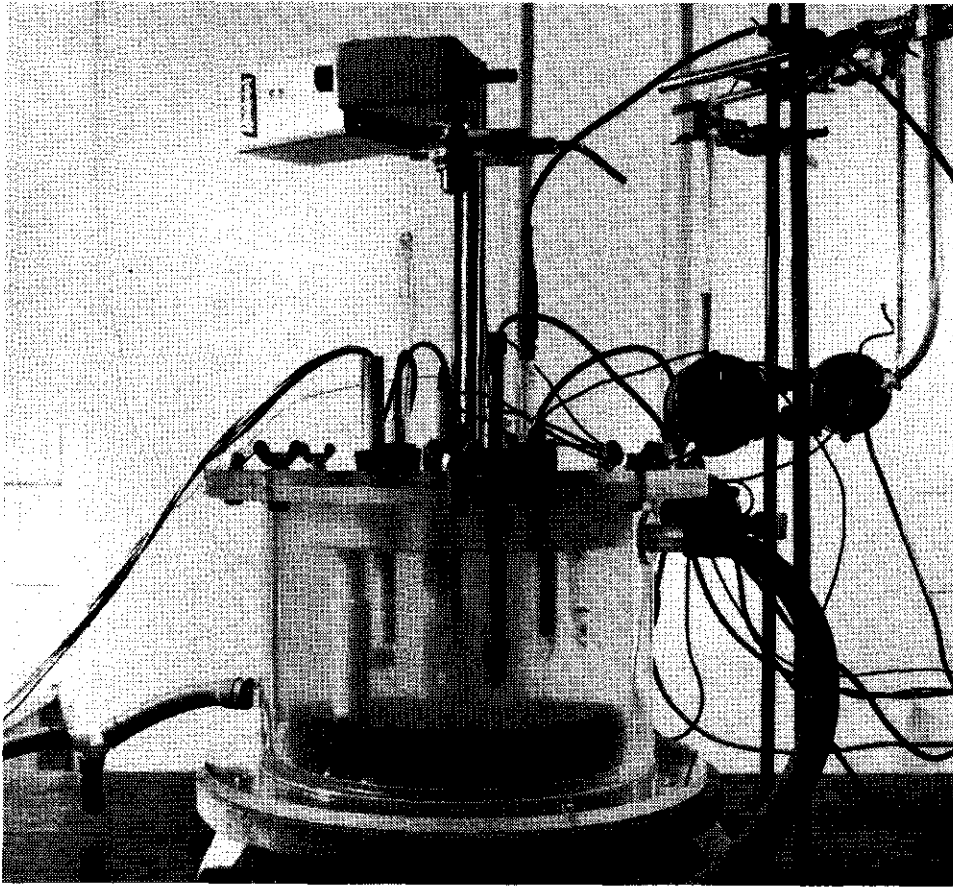
Tijdens denitrificatie in het sediment worden electronendonors uit het sediment verbruikt. Als de electronendonors in de hogere lagen sediment opraken, zal het nitraat vanuit het bovenstaande water steeds dieper in het sediment moeten dringen

voordat denitrificatie plaats vindt. Voor opgeloste zuurstof uit het bovenstaande water geldt hetzelfde (afb. 3). De gedachte was dat m.b.v. redoxpotentiaal (Eh) metingen deze verschuivingen konden worden geregistreerd, mits de volgende aan-

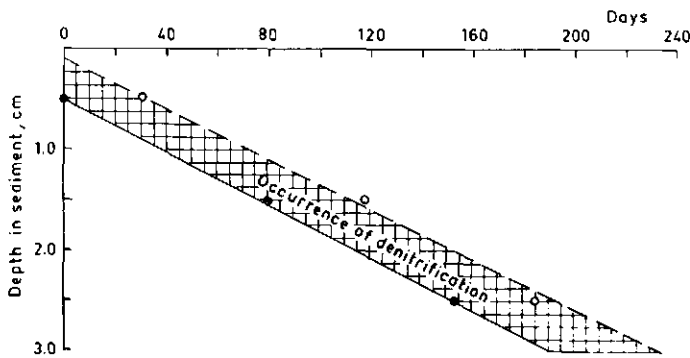
namen werden gemaakt:

- De Eh stijgt tot op zijn hoogst + 100 mV als nitraat in een sterk gereduceerde laag sediment diffundeert.
- Meer positievere waarden worden alleen bereikt als zuurstof in die laag door-dringt.

Om nu de verschuiving van nitraat en zuurstof in het sediment met de tijd te volgen, werd in een reactor van 5,5 l inhoud het volgende experiment uitgevoerd (afb. 8). In het water boven een 3 cm dikke laag sediment A werd de pH op 7, het nitrastikstofgehalte op 25 mg l<sup>-1</sup>, de temperatuur op 15 °C en het opgeloste zuurstofgehalte boven de 6.1 mg l<sup>-1</sup> gehouden. Op 3 diepten in het sediment werd continu de Eh gemeten. Tijdens de incubatie bedroeg de denitrificatiesnelheid in het sediment ongeveer 160 mg  $NO_3^-$ -N m<sup>-2</sup> dag<sup>-1</sup>. Na 235 dagen stopte het denitrificatieproces. Uit de Eh metingen en de bovengenoemde aannamen kon afb. 9 worden afgeleid. Uit deze afbeelding blijkt dat in sediment A onder de geschetste omstandigheden slechts een dunne zone in het sediment actief betrokken is bij de denitrificatie en dat deze zone onder die omstandigheden als gevolg van de



Afb. 8 - De opstelling van de reactor.



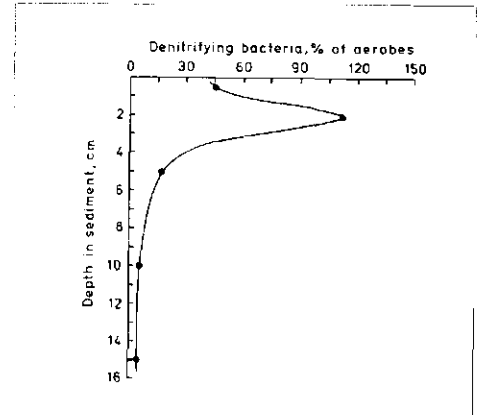
Afb. 9 - De verschuiving van de denitrificatiezone in het sediment gedurende incubatie.  
 o — o Penetratie van zuurstof in het sediment; ● — ● Penetratie van nitraat.

uitputting van de bruikbare electronen donors tijdens de incubatie langzaam dieper in het sediment dringt (0,13 mm dag<sup>-1</sup>). Deze verschuiving kon ruwweg ook waargenomen worden door de verkleuring van het sediment van zwart naar grijsbruin. Het zal duidelijk zijn dat de dikte en de verschuivingsnelheid van de denitrificatie zone sterk afhankelijk is van het gehalte aan beschikbare electronen donors.

**Bacteriologisch onderzoek**

Alleen sediment A werd bacteriologisch

onderzocht, waarbij speciale aandacht werd besteed aan de denitrificerende bacteriepopulatie. Hieruit kwam naar voren dat de grootste aantallen bacteriën in de bovenste 5 cm van het sediment werden gevonden. Het grootste aantal heterotrofe denitrificerende bacteriën, zowel absoluut als in % van het totale aantal heterotrofe aërobe bacteriën, kwam voor op een diepte van 2 cm (afb. 10). Met de gebruikte telmethode werden ruwweg 10<sup>6</sup> heterotrofe denitrificerende bacteriën in 1 g vochtig sediment A uit het veld gevonden. Onder veldomstandigheden bestond de



Afb. 10 - Aantallen heterotrofe denitrificerende bacteriën als percentage van de aantallen aërobe heterotrofen in relatie tot de diepte in het sediment.

populatie van heterotrofe denitrificerende bacteriën in sediment A uit vertegenwoordigers van 8 verschillende geslachten, waarvan *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus* en *Flavobacterium* het sterkst vertegenwoordigd waren. Van deze bacteriën stond alleen vast dat ze in staat waren om te denitrificeren. Dat ze in aanwezigheid van nitraat ook werkelijk denitrificeerden in het sediment, was de vraag. Door sediment A anaëroob in aanwezigheid van nitraat te incuberen, ontwikkelde zich een actief denitrificerende bacteriepopulatie van uiteindelijk ongeveer 10 heterotrofe denitrificerende bacteriën per g vochtig sediment. Deze populatie bestond slechts uit vertegenwoordigers van 4 geslachten, waarvan *Pseudomonas* en *Alcaligenes* verreweg het belangrijkste waren. Uit natuurlijk sediment A en uit sediment A na anaërobe incubatie in aanwezigheid van nitraat kon geen *Thiobacillus denitrificans* geïsoleerd worden. Wel werden er enkele *Thiobacillus*-stammen geïsoleerd die nitraat alleen tot nitriet konden reduceren. Hiervan werden er ruwweg 10<sup>4</sup> per g vochtig sediment geteld.

**De in sediment beschikbare electronendonors voor denitrificerende bacteriën**

Tijdens denitrificatie gebruiken de bacteriën organische en voor zover mogelijk ook anorganische stoffen als electronendonor uit het sediment. De electronendonor voorraad in het sediment wordt voortdurend aangevuld door een voortdurende bezinking van onoplosbaar organisch materiaal (zoals resten van hogere planten en phytoplankton) vanuit het oppervlaktewater naar het sediment. Teneinde meer inzicht te verkrijgen in de beschikbaarheid van de electronendonors in het sediment, zijn chemische analyses en incubatieproeven verricht. Aanvankelijk bestond dit onderzoek uit het toetsen en ontwikkelen van op het sediment toe te passen analysetechnieken.

TABEL II - De verdeling van stikstof in drie monsters sediment ( $\mu\text{g N}$  per g droog sediment).

Stikstof voorkomend in	A	A	B
Vrije aminozuren	13 (0,8 *)	6 (1,2)	1 (0,4)
Gebonden aminozuren	681 (41,5)	80 (16,3)	12 (4,6)
Onbekende organische stoffen **)	566 (34,5)	324 (66,1)	211 (81,2)
Vrij en gebonden ammonia	380 (23,2)	80 (16,3)	30 (11,5)
Totaal	1640	490	260

\*) Getallen tussen haakjes zijn percentages van de totale stikstof hoeveelheid in elk monster.

\*\*) Rekenkundig verkregen waarden.

TABEL III - De totale hoeveelheden, pentosen en en uronzuren in de 4 verzamelde extracten van de sedimenten A en B.

	Hexosen <sup>1)</sup>	Pentosen <sup>2)</sup>	Uronzuren <sup>3)</sup>	Totaal	
				$\mu\text{g}$	%
<b>Sediment A</b>					
1 : koud water	120	20	80	220	5
2 : kokend water	330	730	230	1290	30
3 : 2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1160	1150	1200	3510	83
4 : 72 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1840	960	1240	4230 <sup>4)</sup>	100
<b>Sediment B</b>					
1 : koud water	30	20	20	70	3
2 : kokend water	190	70	230	490	19
3 : 2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	540	1060	500	2100	80
4 : 72 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	940	810	640	2640 <sup>4)</sup>	100

1) Uitgedrukt als  $\mu\text{g}$  glucose per g droog sediment.

2) Uitgedrukt als  $\mu\text{g}$  xylose per g droog sediment.

3) Uitgedrukt als  $\mu\text{g}$  glucuronzuur per g droog sediment.

4) Deze waarde werd verkregen door de hexosen en uronzuren van extract 4 en de pentosen van extract 3 bij elkaar op te tellen.

De gehalten aan vrije aminozuren waren in de 3 onderzochte monsters erg laag vergeleken met die aan gebonden aminozuren (tabel II). Uit het aminozuur patroon van de fractie gebonden aminozuren in de monsters en uit de literatuur vermelde aminozuur patronen van humuszuren (Huntjens, 1975) werd geconcludeerd dat een deel van de aminozuren in de geteste sedimenten mogelijk gebonden was aan humusverbindingen.

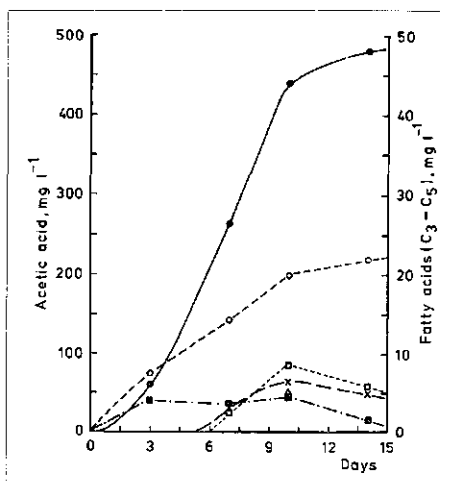
De hoeveelheden aan hexosen, pentosen en uronzuren in sediment A en B werden bepaald in 4 verschillende extracten van elk sediment (tabel III). Extract 1 werd verkregen uit een behandeling van een portie sediment met koud gedestilleerd water. In dit extract losten de water-oplosbare mono- en disacchariden op. Extract 2 werd verkregen uit een behandeling met kokend gedestilleerd water. In dit extract losten naast de koolhydraten van extract 1 enkele polysacchariden op zoals zetmeel en fructosan. Uit de behandeling van sediment met 2N zwavelzuur gedurende 6 uur bij 100 °C ontstond extract 3, waarin naast de koolhydraten van extract 2 de hydrolyse producten van hemicellulose en andere gemakkelijk hydrolyseerbare water-onoplosbare polysacchariden oplossen. Behandeling van sediment met 72 % zwavelzuur resulteerde in extract 4 waarin naast de koolhydraten uit extract 3 ook cellulose en andere polysacchariden die

bestand waren tegen de behandeling voor extract 3 oplossen.

Slechts een kleine hoeveelheid monosacchariden werden in beide sedimenten gevonden. Zetmeel bleek geen belangrijk koolhydraat in beide sedimenten te vormen. Ruwweg 55 % van de koolhydraten in beide sedimenten bestond uit hemicellulosen en andere gemakkelijk hydrolyseerbare onoplosbare polysacchariden. Bij de behande-

Afb. 11 - De accumulatie van vluchtige vetzuren in het bovenstaande water van sediment dat bij 25 °C in afwezigheid van nitraat anaëroob werd geïncubeerd.

● — ● Azijnzuur; ○ — ○ Propionzuur;  
X — X Isoboterzuur; ■ — ■ Boterzuur;  
□ - - - □ Isovaleriaanzuur; Δ Valeriaanzuur.



ling met 72 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bleek een deel van de pentosen te worden gedestruerd (Rhiem, 1962). Van de extracten 3 en 4 werd m.b.v. de GLC-techniek een kwalitatieve suikeranalyse gemaakt, waaruit naar voren kwam dat de toename van de hoeveelheid koolhydraten in extract 4 hoofdzakelijk werd veroorzaakt door glucose. Dit impliceert dat cellulose een belangrijk koolhydraat in het sediment was.

Uit de in beide sedimenten gevonden hoeveelheden organische stof, aminozuren en koolhydraten, werd geconcludeerd dat de organische fractie in sediment hoofdzakelijk bestond uit humusverbindingen (tabellen I, II en III).

Bij incubatie van anaëroob sediment bleek dat de koolhydraten vergist werden waarbij azijnzuur als belangrijkste eindproduct ontstond. Bij afwezigheid van zuurstof en nitraat accumuleerde azijnzuur in het anaëroobe bovenstaande water (afb. 11). Dit azijnzuur werd daarna door obligaat anaëroobe bacteriën omgezet in methaan. In aanwezigheid van nitraat of zuurstof vond geen accumulatie plaats in het bovenstaande water, hoewel uit meerdere proeven kwam vast te staan dat het wel werd geproduceerd. In dit geval werd het azijnzuur hoofdzakelijk geconsumeerd door respectievelijk denitrificerende bacteriën of aëroobe bacteriën. De ophoping van sulfaat in het bovenstaande water van een anaëroob water-sediment-systeem in aanwezigheid van nitraat en de daarmee parallel lopende consumptie van nitraat wijzen erop dat de verkleuring van het sediment van zwart naar bruinachtig berustte op de oxydatie van FeS door denitrificerende bacteriën.

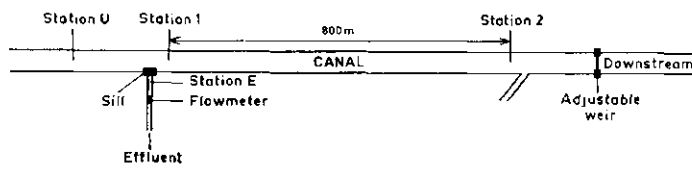
Uit dit onderzoek werd geconcludeerd dat koolhydraten, azijnzuur en sulfiden kunnen worden beschouwd als belangrijke electronendonors voor ademhalende en denitrificerende bacteriën in sedimenten.

## Veldexperiment

In laboratoriumproeven kon duidelijk aangetoond worden dat nitraat uit het bovenstaande water van water-sediment-systemen als gevolg van denitrificatie verdwijnt. Het zal duidelijk zijn dat het uiteindelijke effect van dit proces op het stikstofgehalte van oppervlaktewater afhangt van de denitrificatiesnelheid en de verhouding tussen het watervolume en het sedimentoppervlak. In het hierna kort beschreven veldexperiment is geprobeerd dit effect aan te tonen. Hierbij werd de verdwijning van nitraat uit effluent van de zuiveringsinstallatie te Goor bestudeerd na lozing van het effluent op een kanaal (afb. 12). Gedurende 20 dagen werd in een 800 m lang traject het nitraatverlies bepaald door het analyseren van dagelijks



Afb. 12 - De lozing van effluent over een overstortdremmel in het kanaal.



Afb. 13 - Een schematische weergave van het 800 m lange traject van het kanaal met de effluent debiet meter, overstortdremmel, stuw en de bemonsteringsstations U (bovenstrooms), E (effluent), 1 en 2.

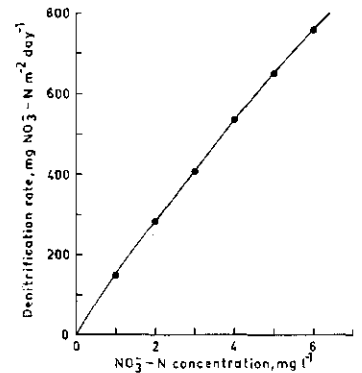
genomen monsters afkomstig van 4 bemonsteringsplaatsen in dit traject (afb. 13). Uit de gegevens van de effluent-flowmeter van de zuiveringsinstallatie en de chloridegehalten in de monsters werd de voor het geheel noodzakelijke dagelijkse waterbalans opgesteld.

Van het nitraat dat bij het begin van het 800 m lange traject in het kanaalwater aanwezig was, verdween 56 % gedurende het doorstromen van het traject. De gemiddelde verblijftijd van het water binnen het traject was 1,7 dagen. De gemiddelde snelheid waarmee het nitraat verdween, uitgerekend over de periode van 20 dagen, bedroeg  $947 \text{ mg NO}_3\text{---N m}^{-2} \text{ dag}^{-1}$ . Bij laatstgenoemd getal kan men zich afvragen in hoeverre er sprake is geweest van immobilisatie van nitraat door waterplanten en algen. Daartoe werden in het donker, dus zonder mogelijke immobilisatie door waterplanten en algen, laboratoriumproeven uitgevoerd met ongestoorde water-sedimentprofielen uit het kanaal. Uit deze waarnemingen werd een gemiddelde relatie tussen de denitrificatiesnelheid en de nitraatconcentratie afgeleid (afb. 14). De nitraatstikstofconcentratie van het kanaalwater aan het begin van het traject varieerde tussen de 0,3 en  $9,9 \text{ mg l}^{-1}$ . Uit afb. 14 wordt hierbij denitrificatie-

snelheid gevonden welke varieerde tussen de 65 en  $1100 \text{ mg NO}_3\text{---N m}^{-2} \text{ dag}^{-1}$ . Hierbij moet direct opgemerkt worden, dat onder vergelijkbare omstandigheden in de natuur altijd hogere waarden voorkomen dan in het laboratorium (zie sectie 'Beïnvloeding denitrificatiesnelheid'), zodat geconcludeerd werd dat het nitraat hoofdzakelijk als gevolg van denitrificatie in het sediment verdween. De denitrificatiesnelheid in het kanaalsediment was aanzienlijk hoger dan die in de sedimenten A en B omdat het watergehalte en het organisch stofgehalte, resp. 855 en 25 mg per g vochtig sediment veel hoger waren.

### Conclusie

Dit onderzoek heeft aangetoond, dat het stikstofgehalte van ondiepe oppervlaktewateren voortdurend en in belangrijke mate wordt verlaagd door het optreden van denitrificatie in sedimenten. Daarbij dient te worden opgemerkt dat bovengenoemd effect bij lage concentraties (kleiner dan  $1 \text{ mg l}^{-1}$  nitraatstikstof in het bovenstaande water) klein moet worden geacht. Een juiste informatie over dit verschijnsel kan veel bezorgdheid over eutrofiëringsproblemen als gevolg van de lozing van stikstofhoudende



Afb. 14 - De relatie tussen de denitrificatiesnelheid in het sediment en de nitraatstikstofconcentratie in het bovenstaande water van ongestoorde watersediment profielen uit het kanaal.

verbindingen doen wegnemen.

De resultaten van dit onderzoek staan uitvoerig beschreven in een proefschrift dat door geïnteresseerden kan worden aangevraagd bij het Laboratorium voor Microbiologie, Hesselink van Suchtelenweg 4 te Wageningen.

Mijn dank gaat uit naar Prof. Dr. Ir. E. G. Mulder in wiens Laboratorium het onderzoek werd uitgevoerd en naar het Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne en de Commissie van Bijstand inzake Stikstofonderzoek voor het dragen van de directe kosten van het onderzoek. Verder ben ik mevrouw C. Möller-Mol en Willy G. J. van Rooyen zeer erkentelijk voor het typen van dit manuscript.

### Literatuur

- Commoner, B., 1971. *Testimony before the Illinois Pollution Control Board*. Edwardsville, Illinois.
- Huntjens, J. L. M., 1972. *Amino acid composition of humic acid-like polymers produced by streptomycetes and of humic acids from pasture and arable land*. *Soil Biol. Biochem.* 4: 339 - 345.
- Kolenbrander, G. J., 1969. *Nitrate content and nitrogen loss in drain water*. *Neth. J. Agric. Sci.* 17: 246 - 255.
- Rhiem, T., 1962. *Hydrolysate aus Holz und Einjahrespflanzen*. In die Hefen, Band II (F. Reiff, R. Kautzmann, H. Lüers and M. Lindemann, Eds.) p. 84 - 89. Verlag Hans Carl, Nürnberg.
- Sommer, K. 1972. *Nitrificide*. Teil II: Ammonium-Nitrificide US-amerikanischer und japanischer Herkunft. *Landwirtschaftl. Forsch.* 27/II. Sonderheft: 74 - 82.
- Vangnai, S. en D. A. Klein, 1974. *A study of nitrite-dependent dissimilatory microorganisms isolated from Oregon soils*. *Soil Biol. Biochem.* 6: 335 - 339.
- Walker, C. G. en D. J. D. Nicholas, 1961. *Nitrite reductase from Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* 49: 361 - 368.